

**Université de Lille - Faculté des sciences et
technologies**

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

Tanina ARAB

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Spécialité : Neurosciences

**Caractérisation des vésicules extracellulaires (VEs)
d'origine microgliale et mise en évidence de leur
effet neurotrophique.**

Soutenue publiquement le 18 janvier 2019 devant le jury composé de :

M. le Dr Philippe Bulet	Rapporteur
M. le Dr Guillaume Van Niel	Rapporteur
Mme. le Dr Morvane Colin	Examinatrice
Mme. le Pr Ikram El Yazidi Belkoura	Invitée
M. le Dr Pierre-Eric Sautière	Directeur de thèse

© Tanina Arab, 2019

**Université de Lille - Faculté des sciences et
technologies**

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

Tanina ARAB

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Spécialité : Neurosciences

**Caractérisation des vésicules extracellulaires (VEs)
d'origine microgliale et mise en évidence de leur
effet neurotrophique.**

Soutenue publiquement le 18 janvier 2019 devant le jury composé de :

M. le Dr Philippe Bulet	Rapporteur
M. le Dr Guillaume Van Niel	Rapporteur
Mme. le Dr Morvane Colin	Examinatrice
Mme. le Pr Ikram El Yazidi Belkoura	Invitée
M. le Dr Pierre-Eric Sautière	Directeur de thèse

© Tanina Arab, 2019

Tu peux fauter, mais jamais mentir.

Tu peux tomber, mais jamais abandonner.

Ton courage et ta dignité seront ta force en toutes circonstances.

Mon papa,

Hadi Arab

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, sans vous le résultat n'aurait pas été le même.

Au directeur du laboratoire PRISM, Pr Michel Salzet et à la co-directrice Pr Isabelle Fournier, merci de m'avoir permis de mener à bien mon projet de recherche au sein de l'unité.

Merci aux Drs Guillaume Van Niel et Philippe Bulet, d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci aux Drs Morvane Colin, Guillaume Van Niel et Etienne Audinat pour votre présence lors des comités de suivi individuel et pour vos critiques constructives qui ont fait évoluer le projet. Au Pr Ikram El Yazidi Belkoura, merci d'avoir accepté de faire partie du jury. Merci également pour votre intérêt et votre implication.

À mon directeur de thèse, Dr Pierre-Eric Sautière, un simple merci ne suffit pas pour te témoigner toute ma gratitude. Je te serai toujours reconnaissante pour ton encadrement de qualité et ton soutien durant ces trois ans. Pour toutes nos discussions, pour ta compréhension et ton comportement plus que correcte à mon égard, un grand merci.

À mon co-directeur de thèse, Dr Jacopo Vizioli, merci pour ces trois ans et pour ton aide précieuse lors des exercices de rédaction pour les papiers comme pour le manuscrit. Merci également pour ta bienveillance et ton inquiétude constante du bon déroulement de la thèse.

Au Pr Christophe Lefebvre, tu as été pour moi un pilier durant cette thèse. Pour tous nos échanges, pour ta pédagogie et ton accessibilité merci infiniment. Tu t'es beaucoup investi pour la réalisation de ce projet et je garde de très bons souvenirs de tes métaphores et de nos réunions en mode *brainstorming*.

À Françoise, ma maman du labo. Je n'ai pas exagéré en te donnant ce surnom dès mon année de master 2. Depuis, tu n'as eu cesse de me le montrer. Pour ta bienveillance, ton grand cœur et ton énergie un énorme merci, et n'oublies pas "*impossible is nothing*". À Christelle, un grand merci pour ton aide précieuse et ton expertise. Merci également pour ton soutien et ton accompagnement. Nos longues discussions m'ont fait beaucoup de bien.

À ma petite Annie, merci pour toutes tes astuces, tes conseils et tes intentions toujours bien fondées. Je te suis très reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi et pour nos chaleureuses retrouvailles. Durant ces trois ans tu as été pour moi un vrai rayon de soleil. Lucie, merci pour ton magnifique travail, constamment présente pour nous faciliter la vie au quotidien. Tu arrives toujours à trouver le moyen de nous sortir des impasses et c'est un réel soulagement pour nous. Tu as une magnifique âme, ne l'oublie jamais.

Nathalie et Véronique, vous faites un travail très honorable. Je ne vous le dis surement pas assez mais merci mille et une fois pour votre contribution à nous fournir un cadre de travail favorable pour être efficaces. Merci pour nos échanges et la chaleur humaine qu'on vous connaît si bien.

Soulaimane, merci cher frère pour tout !! ton expertise en protéomique, ton soutien et ta présence au quotidien, j'attends toujours mon selfie mais je l'aurai un jour je l'aurai. À tous les

thésards, merci pour la bonne ambiance et la convivialité de nos relations avec une attention particulière pour Antonella, Philippe, Khalil, Tony et Tristan. Vous êtes et serez toujours les best et j'espère qu'on gardera contact et qu'on continuera à se charrier comme on l'a toujours fait.

Maxence, merci de m'avoir inspiré et m'avoir donné un exemple à suivre. Ceci t'étonnera peut-être mais j'ai beaucoup appris de toi malgré nos courts échanges. Comme quoi c'est la qualité qui prime et non la quantité. Jean-pascal, merci pour ton travail sur la plateforme, pour nos échanges à la pause-café ainsi que tes conseils et tes encouragements.

Marie, Julien et Franck nous n'avons pas eu l'occasion de travailler ensemble mais je tenais à vous remercier pour nos échanges et votre sympathie. Irène, merci pour tout ce que tu fais pour nous, je te souhaite ce qu'il y a de mieux.

J'adresse également mes remerciements à ceux qui ont quitté le navire au cours de ma thèse. Je pense notamment à Jusal, Francesco, Benoit, et Vivian. Merci pour ces bons moments passés ensemble. Sans oublier Dounia et Stéphanie, les filles je vous adore et je vous souhaite le meilleur dans vos vies personnelles et professionnelles. Bien évidemment, le club des copines Dela, Zahra, Horia et Melodie-Anne, je suis heureuse que nos chemins se soient croisés. Merci pour votre soutien surtout lors des dernières semaines de rédaction. J'ai beaucoup de chance de vous avoir à mes côtés.

À tous les collègues en dehors du laboratoire, Catherine, Morad, Slava, Aurélien, Valério, Katia, Oksana, Alex, Emilie, Christian, Etienne, Mathieu, Claude, Sébastien, Sylvain et Ihsan. Un grand merci pour votre sympathie, pour nos échanges toujours rassurants et avec le sourire. De la même façon, je tiens à remercier particulièrement Tony Lefebvre et Fabrice Alain de l'UGSF et Karim Houali de l'UMMTO pour leur qualité d'enseignement et pour avoir manifesté leur intérêt à mon égard et avoir cru en moi. Vos paroles positives n'ont fait que me booster davantage. Merci d'être de véritables coachs en plus de votre excellence en enseignement.

À mes parents, je ne saurais vous témoigner toute ma gratitude je vous dois tellement. Vous avez toujours fait de votre mieux de notre éducation au respect de nos choix, vous n'avez eu de cesse de nous soutenir et nous encourager à aller de l'avant. Le plus gros des sacrifices pour moi fut de partir loin de vous. Voyez dans ce travail un retour sur votre investissement. Je vous aime très fort et j'espère vous rendre un tant soit peu ce que vous avez fait pour moi.

À mes sœurs à mon frère, merci de m'avoir donné l'exemple à suivre pas facile d'être la petite dernière, vous avez mis la barre très haut. Je suis très fière de vous tous et j'espère qu'on restera toujours aussi soudés. Merci pour votre soutien et vos encouragements.

À ma grande famille, tante et oncle, cousines et cousins merci de toujours être présents dans les bons et les moins bons moments. Je sais que je peux compter sur vous et vous me le prouver jour après jour. Merci d'être une force inépuisable et un vent de bonheur dans ma vie.

À toutes celles et ceux partis trop tôt, je ne vous oublie pas et je vous garde une place de choix dans mon cœur. Le souvenir de vos paroles et vos conseils continus de guider mes pas. Merci de m'inspirer jour après jour, vous me manquez terriblement.

À mes meilleurs ami(e)s Ghania, Sarah, Louiza, Farid et Amine je vous apprécie énormément. Année après année nos liens ne font que se renforcer et votre présence est d'une grande aide. La distance n'y fait rien, nous sommes toujours aussi proches et pour longtemps encore je n'en doute nullement. Merci d'être simplement vous et de faire partie de ma vie.

Un merci particulier à Malika et Nacim Betrouni. Pour votre joie de vivre, votre soutien et votre présence. Pour nos discussions toujours dans la bonne humeur un grand merci. Vous êtes un magnifique exemple à suivre et je vous souhaite le meilleur et tout le bonheur que vous méritez.

À ma moitié, qui me complète si bien. Samir, je te remercie pour ta présence et tes attentions quotidiennes. Merci pour tes inspirations et tes encouragements tout au long du chemin. Nous évoluons ensemble dans le club des 1% et je te remercie d'avoir renforcé mon intérêt pour le monde du développement personnel entourée de Tony Robbins, Steve Abdelkarim, Louise Hay et bien d'autres que je dois d'ailleurs également remercier. Tout est dans le *mind set* et la positive attitude et ça ils savent le faire comprendre.

À toi qui lies ce manuscrit, qui t'en sert comme inspiration dans ta propre rédaction, comme source d'information ou que sais-je, merci pour ton intérêt.

RESUME

Les cellules microgliales sont considérées comme les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC). De nombreuses études ont démontré que ces cellules sont activées et recrutées sur le site de lésion. Les cellules microgliales de sangsue présentent un mode d'activation et de migration similaires post lésion expérimentale du SNC. Cette activation est accompagnée d'une libération massive de vésicules extracellulaires (VEs).

Les VEs sont de petites particules produites par la plupart des types cellulaires et sont présentes dans plusieurs liquides biologiques, notamment la salive, l'urine, le lait maternel, le plasma et le liquide céphalo-rachidien ... Leur taille varie entre 30 nm et 1 µm de diamètre. Selon leur origine cellulaire, deux populations principales ont été décrites. Les exosomes qui sont connus comme des vésicules d'origine endosomales et les microvésicules qui sont générées suite au bourgeonnement de la membrane plasmique.

Les travaux portent sur l'isolement de VEs libérées par des cellules microgliales en culture primaire. Chez la sangsue, ces dernières sont séparées des populations de neurones suite à la dissociation du SNC.

Après quatre jours de culture, les VEs des cellules microgliales ont été isolées du milieu et leur contenu protéique a été analysé par spectrométrie de masse.

D'autre part, les VEs isolées ont été également testées *in vitro* pour leur potentiel à induire une croissance neuritique à la fois sur les neurones de sangsue et des lignées cellulaires de neuroblastome de mammifères.

Mots clefs

Hirudo medicinalis, cellules microgliales, vésicules extracellulaires, contenu protéique, ultracentrifugation, Optiprep™, croissance neuritique.

ABSTRACT

In Mammals, microglial cells are considered as the resident immune cells in central nervous system (CNS). Many studies demonstrated that, after injury, these cells are activated and recruited at the lesion site. Leech microglia presents a similar pattern of microglial activation and migration upon experimental lesion of its CNS. This activation is associated with the release of a large amount of Extracellular Vesicles (EVs).

EVs are small particles produced by numerous cell types and found in several biological fluids including saliva, urine, breast milk, plasma and cerebrospinal fluid ... Their size fluctuates between 30 nm and 1 μ m in diameter. Depending on their cell origin, two EVs populations are reported: exosomes are described to be endosomal vesicles, while microvesicles are generated after plasma membrane shedding.

The main goal of this work was to isolate microglia EVs released in primary culture. For this purpose, microglial cells were separated from neurons after leech CNS dissociation. After four days, EVs were isolated from conditioned medium and their protein content was investigated by mass spectrometry analyses.

In the other hand, EVs were assessed for their potential to induce neurite outgrowth on both leech neurons and mammal neuroblastoma cell lines.

Keywords

Hirudo medicinalis, microglia, extracellular vesicles, protein content, ultracentrifugation, Optiprep™, neurite outgrowth.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	4
RESUME	7
ABSTRACT	8
SOMMAIRE.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS	14
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX	16
INTRODUCTION.....	19
1.1 Les cellules microgliales : des cellules immunitaires résidentes à multiples facettes	19
1.1.1 Le système nerveux central chez la sangsue	21
1.1.2 Recrutement des cellules microgliales à la lésion	22
1.2 Les vésicules extracellulaires	25
1.2.1 Historique	25
1.2.2 Nomenclature	28
1.2.3 Biogenèse des vésicules extracellulaires	30
1.2.3.1 La voie endosomale (les exosomes)	30
1.2.3.1.1 Biogenèse ESCRT dépendante	31
1.2.3.1.2 Biogenèse ESCRT Independent	35
1.2.3.1.2.1 Voie lipidique	35
1.2.3.1.2.2 Voie des tétraspanines	35
1.2.3.1.3 Tri des CMV : balance entre dégradation et sécrétion	36
1.2.3.1.4 Transport, ancrage membranaire	39
1.2.3.1.5 Fusion et libération	40
1.2.3.2 Le bourgeonnement membranaire (ectosomes, microvésicules) : biogenèse et libération	42
1.2.4 Internalisation des vésicules extracellulaires par les cellules cibles	46
1.2.4.1 Liaison à la membrane	48
1.2.4.1.1 Interaction protéine-protéine	48
1.2.4.1.2 Mécanismes d'endocytose	48
1.2.4.1.2.1 La macropinocytose	49
1.2.4.1.2.2 La phagocytose	49
1.2.4.1.2.3 Internalisation clathrine dépendante	50
1.2.4.1.2.4 Internalisation clathrine indépendante	50
1.2.4.1.2.4.1 Internalisation cavéoline dépendante	50
1.2.4.1.2.4.2 Endocytose faisant intervenir des radeaux lipidiques	51
1.2.4.1.3 Fusion avec la membrane plasmique	51
1.2.5 Cargo des vésicules extracellulaires	53
1.2.5.1 Contenu protéique	53

1.2.5.2	Contenu lipidique.....	56
1.2.5.3	Contenu en acides nucléiques	59
1.2.5.3.1	Acides ribonucléiques (ARN)	59
1.2.5.3.2	Acide désoxyribonucléique (ADN)	61
1.2.6	Techniques d'études des vésicules extracellulaires : applications sur le cargo protéique	62
1.2.6.1	Enrichissement en vésicules extracellulaires	62
1.2.6.1.1	Méthodes conventionnelles	62
1.2.6.1.1.1	L'ultracentrifugation	62
1.2.6.1.1.2	Ultracentrifugation en gradient de densité	62
1.2.6.1.1.3	Co-précipitation	63
1.2.6.1.1.4	Chromatographie d'exclusion stérique	63
1.2.6.1.2	Nouvelles méthodes	64
1.2.6.1.2.1	Filtration microfluidique	64
1.2.6.1.2.2	Capture en immuno-affinité.....	66
1.2.6.1.2.3	Tri par ondes acoustiques sans contact	67
1.2.6.1.3	Conclusion pour la partie technique	67
1.2.6.2	Caractérisations morphologique et quantitatives	68
1.2.6.2.1	Techniques basées sur la microscopie électronique	68
1.2.6.2.1.1	Microscopie électronique à balayage	68
1.2.6.2.1.2	Microscopie électronique à transmission	69
1.2.6.2.1.3	Cryo-Microscopie Electronique (cryo-ME)	69
1.2.6.2.1.4	Tomographie électronique (TE)	69
1.2.6.2.1.5	Microscopie à Force Atomique (MFA)	70
1.2.6.2.2	L'analyse NTA (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>).....	70
1.2.6.2.3	L'analyse TRPS (<i>Tunable Resistive Pulse Sensing</i>).....	71
1.2.6.3	Etudes protéomiques.....	72
1.2.6.3.1.1	Western blot (WB) et ELISA.....	72
1.2.6.3.1.2	Spectrométrie de masse	73
1.2.6.3.1.3	Cytométrie en flux.....	74
1.3	Emergence autour des fonctions vésiculaires : accent sur les VEs d'origine microgliale	75
1.3.1	Les vésicules extracellulaires dans les pathologies du SNC	75
1.3.2	Un dialogue cellulaire médié par les VEs dans le SNC	76
1.3.2.1	Vésicules secretées par les cellules microgliales	77
1.3.2.2	Vésicules internalisées par les cellules microgliales	78
	OBJECTIF DE LA THESE	80
	MATERIEL ET METHODES.....	81
1.1	Dissection du système nerveux central de la sangsue	81
1.2	Cultures cellulaires	82
1.2.1	Culture primaire des cellules microgliales et des neurones de sangsue	82
1.2.2	Culture des lignées de mammifères	82
1.3	Isolement des vésicules extracellulaires microgliales.....	84
1.4	Quantification des vésicules extracellulaires	86

1.5	Observation de la morphologie des vésicules extracellulaire isolées	86
1.6	Etudes du cargo protéique des VEs isolées par Spectrométrie de masse	87
1.6.1	Annotation des bases de données sangsue.....	87
1.6.2	Préparation des échantillons	87
1.6.3	Analyse en spectrométrie de masse.....	89
1.6.4	Analyse Bioinformatique	90
1.7	Détection des signatures vésiculaires en immunomarquage	91
1.7.1	Western Blot.....	91
1.7.1.1	L'électrophorèse en gel SDS-PAGE.....	91
1.7.1.2	Transfert et révélation	92
1.7.2	Immunohistochimie des chaines nerveuses de sangsue	92
1.8	Tests fonctionnels.....	94
1.8.1	Culture primaire de neurones de sangsue.....	94
1.8.2	Lignées cellulaires mammifères.....	94
RESULTATS		96
1.1	La filtration permet de séparer les cellules microgliales des neurones	97
1.2	Activation ATP dépendante	98
1.2.1	L'ATP n'induit pas de changements dans la taille mais dans la quantité des VEs secretées par les cellules microgliales.....	98
1.2.2	Effet sur le contenu protéique des vésicules extracellulaires issues de cellules microgliales activées à l'ATP	99
1.3	Analyse des vésicules extracellulaires activées uniquement sous l'effet de la dissection (lésion)	99
1.3.1	Une étape supplémentaire en gradient induit une diminution du rendement en nombre de particules quantifiées	100
1.3.2	Les cellules microgliales de sangsue secrètent des VEs morphologiquement similaires à celles de mammifères.....	101
1.3.3	Caractérisation protéique par spectrométrie de masse.....	102
1.3.3.1	Annotation des banques de données	102
1.3.3.2	L'isolement des VEs avec une ultracentrifugation supplémentaire en gradient Optiprep™ permet une amélioration du nombre de protéines identifiées	102
1.3.3.3	La purification par ODG sépare efficacement les vésicules extracellulaires des contaminants protéiques	105
1.3.3.4	Les vésicules extracellulaires de sangsue ont des signatures similaires à celles identifiées chez les mammifères	108
1.3.3.5	Les protéines identifiées dans les vésicules extracellulaires isolées par ODG sont impliquées dans des voies de signalisation de biogénèse de vésicules et portent une signature neuronale	112
1.3.4	Validation par immunodétection de l'étiquette vésiculaire chez la sangsue	115
1.4	Les vésicules extracellulaires microgliales de sangsue ont un effet sur l'induction de la croissance neuritique sur les neurones de sangsue	118
1.4.1	Tests fonctionnels sur les cellules du phéochromocytome de la médullosurrénale de rat (PC-12), avec les VEs isolées par ultracentrifugation	119
1.4.2	Tests fonctionnels avec les VEs isolées par Optiprep™ (ODG).....	122

1.4.2.1	Sur les neurones de sangsue.....	122
1.4.2.2	Sur la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y	124
DISCUSSION.....		128
CONCLUSION/PERSPECTIVES.....		140
BIBLIOGRAPHIE		143
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS		163
AUTORISATIONS D'UTILISATION DES FIGURES.....		167
ANNEXES		215

LISTE DES ABREVIATIONS

AAA + : ATPases Associated with various cellular Activities
ADN : Acide DéoxyriboNucléique
ADNmt : ADN Mitochondrial
Ago2 : Argonaute 2
AKT : serine/threonine-protein kinase
ALIX: Apoptosis-Linked Gene 2-Interacting Protein X
AP-2: Adaptor Protein-2
APP: Amyloid Precursor Protein
ARF6: ADP-Ribosylation Factor 6
ARMM: ARrestin domain-containing protein 1 Mediated Microvesicles
ARNi : Acides Ribonucléique Interférents
ARNr : Acides Ribonucléique Ribosomique
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
ARRDC1 : Arrestin Domain-Containing Protein 1
ATP : Adénosine TriPhosphate
BDNF : Brain Derived Neurotrofic Factor
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
CAV-1 : cavéoline-1
CD4+ : Cluster de Différenciation 4
CHMP : Charged Multivesicular Body Protein
CMH-II : Complexe Majeur d’Histocompatibilité de classe II
CMVs : Corps MultiVésiculaires
CN : Chaîne Nerveuse
cryo-ME : CRYO Microscopie Electronique
CXCR3 : C-X-C Motif Chemokine Receptor 3
DLD : Déplacement Latéral Déterministe
EMAPII: Endothelial-Monocyte-Activating Polypeptide II
EPS 15: Epidermal growth factor receptor pathway Substrate 15
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EVi: Evenness Interrupted
FSEV: French Society for Extracellular Vesicles
GAPDH: GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase
GDP: Guanosine Di-Phosphate
GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP: Guanosine Tri-Phosphate.
HDL: High-Density Lipoproteins
HEK: Human Embryonic Kidney cells
Hm: *Hirudo medicinalis*
HmC1qBP: *Hirudo medicinalis* Complement C1q Binding Protein
HmCalR: *Hirudo medicinalis* Calreticulin Receptor
HRS: Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Regulated tyrosine kinase Substrate
Hsp: Heat Shock Proteins
HSPG: Héparane-Sulfate ProtéoGlycane
Iba1: Ionized calcium binding adaptor molécule 1
ICAM : InterCellular Adhesion Molécule
IL-16 : Interleukine 16
IP-10: Interferon-inducible Protein 10
ISEV: International Society for Extracellular Vesicles
JEV : Journal of Extracellular Vesicles
LMP : Latent Membrane Protein 1
LPS : Lipopolysaccharide

MA : **M**aladie d'**A**lzheimer
MCT1 : **M**ono**C**arboxylate **T**ransporter **1**
MEB : **M**icroscopie **E**lectronique à **B**alayage
MET : **M**icroscopie **E**lectronique à **T**ransmission
MFA : **M**icroscopie à **F**orce **A**tomique
miARN: **m**icro**A**RNA
miRISC: **mi**RNA- **I**nduced **S**ilencing **C**omplex
MLCK: **M**yosin **L**ight-**C**hain **K**inase
MT1-MMP: **M**embrane **T**ype **1**-**M**atrix **M**etallo**P**roteinase
MβCD: **M**ethyl-**β**-**C**yclo**D**extrin
Nef: **N**egative **R**egulatory **F**actor
NF-κB: **N**uclear **F**actor-**K**appa **B**
NK: **N**atural **K**iller
NO: **M**onoxide d'**A**zote
NSF : **N**-ethylmaleimide-**S**ensitive **F**usion protein
nSMase1: **N**eutral **S**phingo**M**yel**A**SE-**1**
NTA: **N**anoparticles **T**racking **A**nalysis
PC-12 : **P**héo**C**hromocytome de la médullosurrénale de reins **C**lone **12**
PI₃K: **P**hospho**I**nositide **3**-**K**inase
PI₃P: **P**hospho**I**nositol-**3**-**P**hosphate
PIKfyve: **fy**ve finger-containing **P**hospho**I**nositide **K**inase
PKC: **P**hospho **K**inase **C**
PKM2: **P**yruvate **K**inase de type **M2**
PS: **P**hosphatidyl**S**érine
RAB-GTPase: **RAS**-related in **B**rain-**G**uanosyl **T**ri-**P**hosphatase
RTf : **R**écepteur à la **T**ransferrine
Slac2b : l'exophiline 5
Slp4 : **S**ynaptogamine-**L**ike **P**rotein **4**
SNAP23 : **S**ynaptosomal **A**ssociated **P**rotein **23**
SNARE : **S**oluble **N**-éthylmaleimide-sensitive-factor **A**ttachment protein **R**Eceptor
SNC : **S**ystème **N**erveux **C**entral
SNF 7: **S**olute **C**arrier **F**amily 6 member **7**
STAM: **S**ignal **T**ransducing **A**daptor **M**olécule
SYX-5: **S**yntaxin **5**
Tau: **T**ubulin-**A**ssociated **U**nit
TBI: **T**raumatic **B**rain **I**njury
TE: **T**omographie **E**lectronique
TGN: **T**rans-**G**olgi-**N**etwork
TIM4 : **T**-cell **I**mmunoglobulin **M**ucin protein **4**
TLR: **T**oll **L**ike **R**eceptor
TRBP: **T**ransactivating **R**esponse **R**NA-**B**inding **P**rotein
TRPS: **T**unable **R**esistive **P**ulse **S**ensing
TSG 101: **T**umor **S**usceptibility **G**ene **101**
TSPN : tetraspanine
VAMP : **V**esicle **A**ssociated **M**embrane **P**rotein
VDC : **V**ésicules **D**épendant de la **C**avéoline
VEs : **V**ésicules **E**xtracellulaires
VILs : **V**ésicules **I**ntra**L**uminales
VPS4: **V**acuolar **P**rotein **S**orting-associated protein**4**
VRC : **V**ésicules **R**ecouvertes de **C**lathrine
VTA-1 : **V**ps **T**wenty **A**ssociated **1**
WNT 11: **W**ingless-type **M**MTV integration site family

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Dessins de Del Rio-Hortega (1919).

Figure 2 : Anatomie du SNC de sangsue et organisation cellulaire d'un ganglion au niveau du SNC de sangsue.

Figure 3 : Mise en évidence de l'accumulation microgliale.

Figure 4 : Coupe de plaquettes intactes faite immédiatement après la séparation du sang citraté.

Figure 5 : Microscopie électronique d'exosomes de cellules dendritiques immunomarqués frais.

Figure 6 : Gamme de taille des principaux types de vésicules membranaires.

Figure 7 : Description schématique du trafic vésiculaire et de sa régulation par les GTPases RAB.

Figure 8 : Représentation du complexe ESCRT.

Figure 9 : Modèle de tri des protéines dépendant de l'ubiquitine par la machinerie ESCRT.

Figure 10 : Interdépendance des voies de trafic intracellulaire dans la formation de vésicules extracellulaires.

Figure 11 : Microparticules cellulaires : dissémination d'effecteurs bioactifs.

Figure 12 : Réponse de la membrane plasmique à la stimulation cellulaire.

Figure 13 : Devenir des vésicules extracellulaires dans les cellules réceptrices.

Figure 14 : La voie de fusion par hémifusion de la bicouche lipidique.

Figure 15 : Pourcentage des applications en aval de l'isolement des VEs.

Figure 16 : Cargo protéique des vésicules extracellulaires.

Figure 17 : Voie de biogenèse des miARN.

Figure 18 : Méthodes de filtrage microfluidique pour l'isolement et le tri des vésicules extracellulaires.

Figure 19 : Séparation de VEs à l'échelle nanométrique par déplacement latéral déterministe Nano-DLD.

Figure 20 : Enrichissement par immunoaffinité.

Figure 21 : Différentes micrographies de vésicules extracellulaires

Figure 22 : Quantification des vésicules extracellulaire par NTA (Nanoparticle Tracking Analysis).

Figure 23 : Dialogue médié par les vésicules extracellulaires de et vers les cellules microgliales

Figure 24 : Stratégies de collecte et d'isolement des vésicules extracellulaires.

Figure 25 : Mesure de l'effet des vésicules (culot-UC) sur l'induction de la croissance neuritique dans la lignée cellulaire PC-12.

Figure 26 : Coloration au Hoechst des noyaux cellulaires.

Figure 27 : Impact de l'activation ATP dépendante.

Figure 28 : Analyse des particules avec la technologie NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) sur les vésicules extracellulaires microgliales.

Figure 29 : Microscopie électronique à transmission des vésicules extracellulaires.

Figure 30 : Diagrammes de Venn indiquant le nombre de protéines identifiées dans les échantillons UC et ODG.

Figure 31 : Cartographie des protéines quantifiées sans marquage et regroupées pour les trois réplicas (R1, R2, R3) des fractions ODG, représentée sous forme d'un *Heat map*.

Figure 32 : Analyse de la localisation subcellulaire des protéines identifiées dans vésicules extracellulaires.

Figure 33 : Comparaison entre les protéines des fractions ODG-positives et celles des vésicules microgliales ExoCarta.

Figure 34 : Vue d'ensemble du réseau d'interactions protéine-protéine des vésicules extracellulaires.

Figure 35 : caractérisation moléculaire de la protéine Alix chez la sangsue (*HmAlix*).

Figure 36 : Immunodetection des vésicules extracellulaires.

Figure 37 : Apparition de nanostructures en co-culture neurones-cellules microgliales.

Figure 38 : Test de densité et de support pour la culture cellulaire de PC-12.

Figure 39 : Mesure de l'effet des VEs microgliales sur les cellules PC-12

Figure 40 : Mesure de l'effet vésiculaire sur les neurones de sangsue.

Figure 41 : Ajustement de la densité de cellules pour la culture des cellules SH-SY5Y.

Figure 42 : Détermination de la quantité de vésicules extracellulaires nécessaires pour l'induction de la croissance neuritique sur les SH-SY5Y.

Figure 43 : Mesure de l'effet vésiculaire sur les cellules SH-SY5Y.

Figure 44 : Comparaison entre les optimisations réalisées au laboratoire et chez HCS Pharma.

Figure 45 : Evolution des articles sur les vésicules extracellulaires.

Figure 46 : Représentation d'une vésicule extracellulaire microgliale de sangsue.

Figure 47 : Influence du TGF- β dans les essais de croissance neuritique.

Figure 48 : Test préliminaire de l'effet vésiculaire sur les cellules N1E115 (neuroblastome de rat).

Tableau 1 : Etude du cargo lipidomique dans les vésicules extracellulaires.

Tableau 2 : Détail des conditions d'acquisition et d'analyse pour la quantification NTA.

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour la détection des vésicules.

Tableau 4 : Comparaison entre les protéines ExoCarta et les protéines identifiées dans le culot-UC et les fractions ODG.

INTRODUCTION

1.1 Les cellules microgliales : des cellules immunitaires résidentes à multiples facettes

Les cellules microgliales sont des macrophages résidents du système nerveux central (SNC) et représentent dans le cadre du maintien de l'homéostasie cérébrale, la première ligne de défense contre les agents pathogènes [1]. Le terme « *microglia* » a été introduit pour la première fois en 1919 par Del Rio-Hortega lors de ses études menées sur le SNC. Grâce à une technique de marquage au carbonate d'argent il a pu visualiser de manière très précise les cellules microgliales et plus tard les oligodendrocytes (figure 1) pour en reproduire la structure dans des dessins fidèles à ce qu'on peut observer de nos jours par les techniques modernes d'immunofluorescence [2].

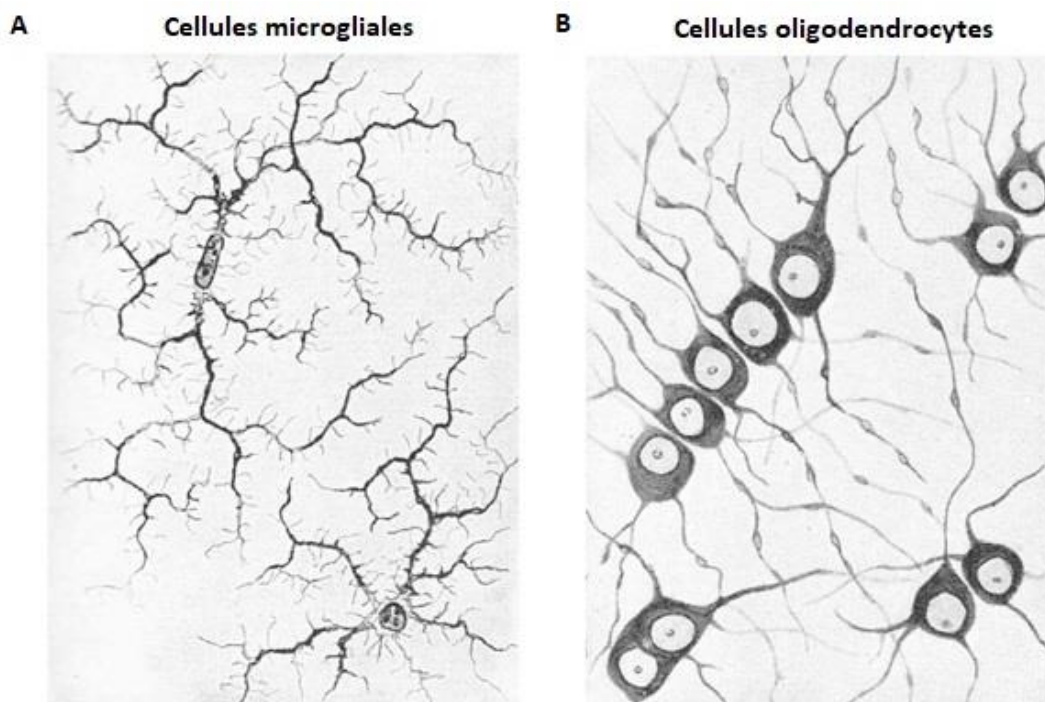


Figure 1 : Dessins de Del Rio-Hortega (1919). Découvertes des cellules microgliales (A) et oligodendrocytes (B) par la technique de carbonate d'argent (Adapté et réimprimé avec permission à partir de [3]) . Copyright 2007 Elsevier.

Les cellules microgliales jouent un rôle clé dans la régulation immunitaire en produisant des facteurs solubles tels que les chimiokines ou les cytokines et des radicaux libres connus pour induire des réponses inflammatoires [4]. Des études ont montré que, lors du développement embryonnaire, les cellules myéloïdes primitives dérivées du sac vitellin sont les précurseurs de

Introduction

la microglie et migrent ensuite dans le neuroépithélium [5]. Les cellules microgliales restent dans le SNC, d'où leur appellation de cellules immunitaires résidentes. Elles sont capables d'un auto-renouvellement efficace sans la contribution des cellules myéloïdes périphériques [6]. La microglie est également connue pour sa grande motilité, en effet, les prolongements portés par les corps cellulaires sont constamment en mouvements dynamiques, se rétractent et se prolongent pour surveiller de manière continue le parenchyme environnant, tandis que les corps cellulaires restent immobiles. Ces observations réalisées *in vivo* sur des souris transgéniques ont brisé un dogme quand à la connaissance de l'état physiologique de la microglie [7]. Des fonctions importantes ont été également démontrées au cours de la neurogenèse comme par exemple le soutien trophique des neurones [8]. Le remodelage des voies axonales et les connexions synaptiques font également partie des rôles physiologiques émergents de la microglie au cours du développement, contribuant globalement à la maturation efficace des circuits neuronaux [9]. Les cellules microgliales sont aussi étudiées pour leurs implications dans des pathologies du SNC et malgré une littérature riche, de nombreuses controverses sur la fonction microgliale doivent encore être résolues.

Dans plusieurs cas, la réponse microgliale exacerbée peut contribuer de manière significative, à une perte aberrante de connexions synaptiques conduisant à la dégénérescence neuronale [10]. En outre, les cellules microgliales sont des acteurs majeurs de la neuroinflammation, car elles sont les principales sources de médiateurs inflammatoires dans le SNC, comme les cytokines [11]. La réponse neuroinflammatoire médiée par les cellules microgliales tend au premier abord à résoudre le problème lié à une présence de pathogènes et donc restaurer l'homéostasie cérébrale dans une dynamique neuroprotectrice.

Des études ont montré que les cellules microgliales chez la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*, présentent des propriétés similaires d'activation. De manière intéressante, après lésion de la chaîne nerveuse (CN) chez la sangsue, un recrutement massif des cellules microgliales est observé au site de lésion. Ce mécanisme semble essentiel dans le cadre d'une reconstruction synaptique, d'une repousse neuritique [12] et d'une récupération fonctionnelle motrice [13].

1.1.1 Le système nerveux central chez la sangsue

H. medicinalis est un Annélide (Errantia, Clitellata). Cette espèce est étudiée en neuroscience pour la particularité structurale de son système nerveux central. En effet, le SNC se présente sous forme d'une chaîne nerveuse, localisée en position médio-ventrale protégée par un sinus sanguin. Il est constitué de 4 ganglions innervant la partie antérieure de l'animal fusionnés en deux masses distinctes, le ganglion cérébroïde (ou supra œsophagiens) à rôle essentiellement neurosécréteur [14] et le ganglion sous œsophagien, innervant la ventouse antérieure péribuccale [15]. Un ganglion segmentaire innerve chaque métamère du corps de l'animal soit 21 ganglions métamériques et enfin 7 ganglions sont fusionnés à l'extrémité postérieure et innervent principalement la ventouse postérieure (figure 2). Les ganglions sont reliés par deux connectifs longitudinaux constitués de fibres nerveuses et d'un mince connectif médiant appelé nerf de Faivre. Chaque ganglion contient environ 400 neurones et est relié aux neurones des ganglions voisins par des axones. D'autres types cellulaires (figure 2b) sont présents dans le SNC de sangsue : les cellules macrogliales ou six cellules gliales géantes du paquet qui enveloppent les corps cellulaires des neurones, deux cellules gliales du neuropile entourant la naissance des axones dans les ganglions et deux cellules gliales des connectifs entourant les axones dans les connectifs. Dans le SNC adulte, sont également présentes des cellules microgliales de petite taille ($\approx 5\mu\text{m}$) réparties en nombre aussi bien dans les ganglions (plus de 10000 cellules/ganglion) que dans les connectifs (≈ 2000 cellules/connectif) [16]. Cette structure de la chaîne nerveuse est propice à l'étude sur la spécificité des connexions synaptiques, ainsi qu'à la cartographie des neurones dans chaque ganglion. Dans un premier temps, trois types de neurones sensoriels ont été déterminés les neurones tactiles (T), de pressions (P) et nociceptifs (N) [17]. Par la suite, les motoneurones (M) ont été identifiés [18]. Chez la sangsue médicinale, les neurones sensoriels lésés peuvent développer de nouvelles connexions synaptiques, avec un degré élevé de spécificité, permettant de restaurer le mouvement locomoteur [19]. Cette capacité de régénération des synapses a été démontrée *in vitro* avec des ganglions de sangsues isolés. Les mécanismes de régénération ont été approfondis en tenant compte des autres types cellulaires présents à proximité des neurones lésés. L'injection de protéases dans les cellules gliales géantes permet de les éliminer de manière spécifique. Leur disparition n'affecte cependant pas les mécanismes de réparation et de reconnexion synaptiques [19,20]. Ces résultats suggèrent que ces cellules macrogliales ne semblent pas essentielles pour engager la repousse axonale. Les cellules microgliales, recrutées au site de lésion semblent donc présenter un réel potentiel pour induire la réparation des neurones lésés.

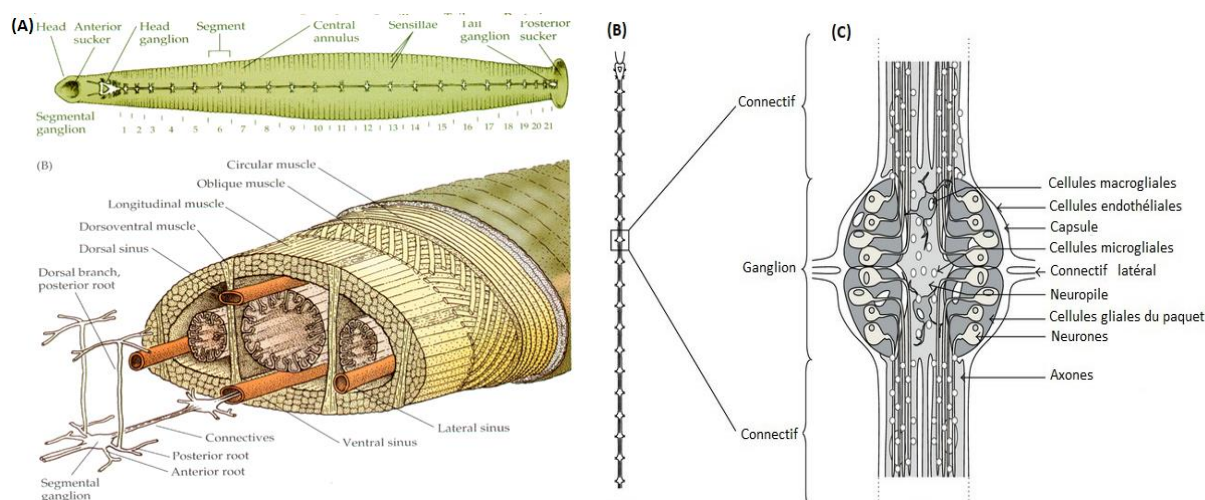


Figure 2 : Anatomie du SNC de sangsue et organisation cellulaire d'un ganglion. **A.** Diagramme du système nerveux de la sangsue contenant un ganglion cérébroïde, un ganglion sous œsophagien, 21 ganglions segmentaires et 7 ganglions postérieurs fusionnés, reliés par des connectifs. **B.** schéma de la chaîne nerveuse avec l'agrandissement d'un ganglion **C.** La vue dorsale du ganglion présente des cellules gliales du paquet enveloppant les corps cellulaires neuronaux. Les axones traversent le neuropile entourés par les cellules macrogliales du neuropile et se prolongent dans les connectifs entourés par les cellules macrogliales des connectifs. Des milliers de cellules microgliales sont réparties dans les ganglions et les connectifs. Le système nerveux est protégé par la capsule externe conjonctive, recouverte à l'extérieur par l'endothélium (Adaptée et réimprimée avec permission, de [21]). Copyright 2012 Tahtouh et al; licence BioMed Central

1.1.2 Recrutement des cellules microgliales à la lésion

L'activation des cellules microgliales de sangsue présente des similitudes avec celle des mammifères. Le marqueur cellulaire Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) a récemment été utilisé pour mettre en évidence cette population cellulaire [22]. Suite à une lésion expérimentale de la chaîne nerveuse, une accumulation assez rapide de cellules microgliales est observée au site de lésion (figure 3). Des études antérieures qui seront développées ci-dessous, menées afin de déterminer les mécanismes qui régissent ce recrutement ont montré que chez la sangsue plusieurs chimioattractants venant de neurones ou des cellules gliales sont impliqués.

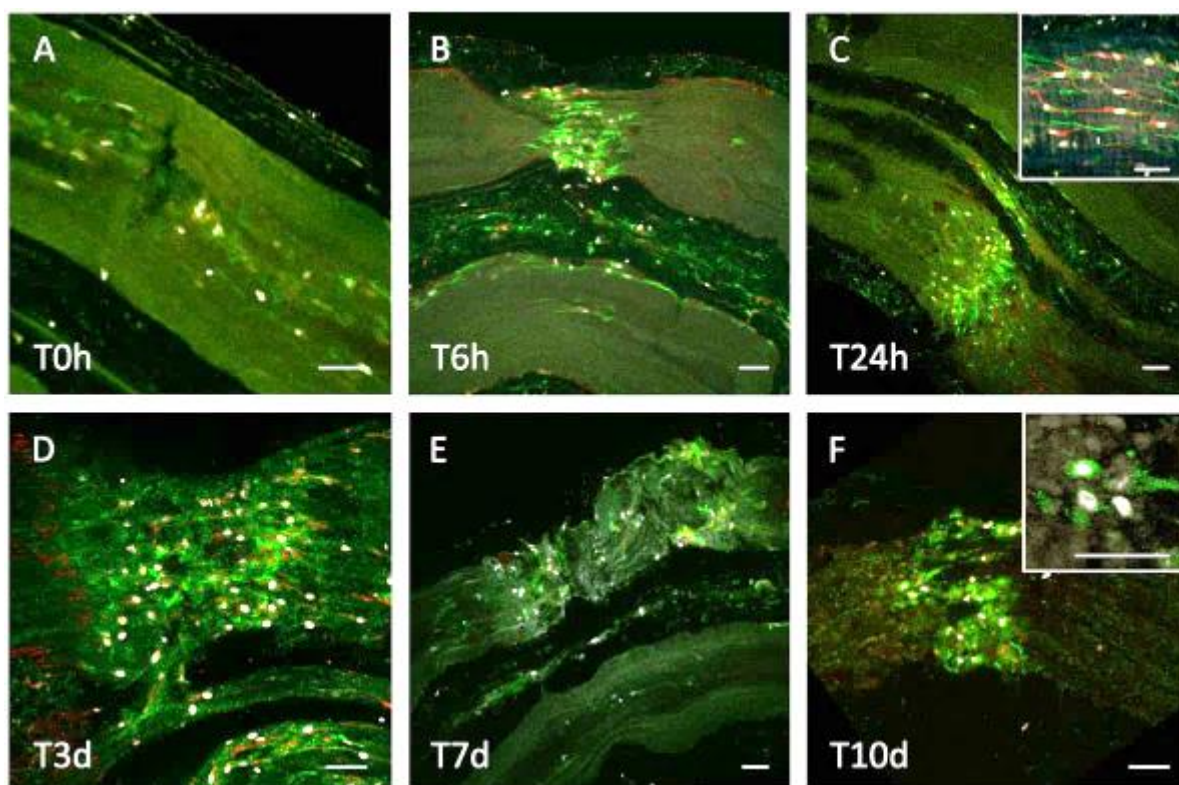


Figure 3 : Mise en évidence de l'accumulation microgliale. A-F Immunohistochimie sur chaîne nerveuse *in toto* chez la sangsue. Les connectifs sont lésés et observés à différents temps post lésion (T0, 1h, 3d, 7d et 10 jours). Un double immunomarquage a été réalisé : anti-*Hmlba1* (vert) et anti-gliarine (rouge). Tous deux marquent spécifiquement la microglie. Les noyaux cellulaires ont été contre-colorés au Hoechst 33342 (blanc). L'encart de la figure C montre un détail de colocalisation de *Hmlba1* et de la gliarine dans des cellules microgliales de forme allongée. L'encart de la figure F montre la morphologie arrondie des cellules *Hmlba1* positives accumulées au site de la lésion. La barre d'échelle indique 20 μ m. (Adapté et réimprimé avec permission, de [22]). Copyright 2014 Wiley Periodicals.

L'adénosine triphosphate (ATP) par la voie des récepteurs purinergiques, particulièrement le P2X7 [23] est considéré comme un activateur général de microglie. Sa libération par les cellules nerveuses chez la sangsue est régulée *via* le canal innexine/pannexine [24]. Le monoxyde d'azote (NO) est aussi un chimioattractant capable de recruter de manière dose dépendante les cellules microgliales d'*Hirudo* dans les quelques minutes qui suivent la lésion [25]. L'inhibition de la libération de ces deux facteurs retarde l'induction de la repousse neuritique [12]. D'autres effecteurs immunitaires à activité chimioattractante, et homologues à ceux retrouvés chez les mammifères, ont été caractérisés chez la sangsue comme l'EmapII (*Endothelial-monocyte-activating polypeptide II*) [26], l'IL-16 (interleukine 16) [27] et le C1q (facteur du complément C1) [28].

Chez les mammifères, EmapII est un marqueur traduisant l'activation des cellules microgliales [29]. Chez la sangsue, l'expression d'un gène codant pour *HmEmapII* (*Hirudo medicinalis*

Introduction

Endothelial-monocyte-activating polypeptide II) résulte de l'activation d'une voie de signalisation TLR (*Toll like Receptor*), plus précisément *HmTLR1*, un homologue du TLR1 des mammifères [26,30]. Étant donné que la molécule CXCR3 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*) est le récepteur naturel de l'EmapII humain, des essais de chimiotactisme sur la microglie de sangsue ont été réalisés en utilisant soit un anticorps anti-CXCR3, soit l'IP-10 (*interferon-inducible protein 10*), un agoniste de CXCR3. Les résultats ont montré un effet compétitif permettant la réduction de la migration de la microglie induite par EmapII, suggérant l'existence d'une molécule apparentée à CXCR3 chez la sangsue [26].

IL-16 est une cytokine chez les mammifères qui présente une activité chimioattractante pour les lymphocytes CD4+ (Cluster de Différenciation 4) [31] et une activité proinflammatoire suite à sa libération par les lymphocytes et les cellules microgliales [32]. Chez la sangsue, *HmIL-16* est libérée par les extrémités des neurones lésés et sert de chimioattractant pour les cellules microgliales qui présenteraient un récepteur à l'IL-16 homologue au CD4 [27].

C1q appartenant au facteur du complément C1, est un médiateur inflammatoire et considéré comme une molécule clé dans les maladies neurodégénératives chez les mammifères [33] l'homologue de ce facteur chez la sangsue, *HmC1q*, est un acteur de l'activation microgliale qui aurait une origine neuronale et/ou microgliale [34]. Deux récepteurs à l'*HmC1q* ont été caractérisés chez la sangsue et nommés *HmC1qBP* (*Complement C1q Binding Protein*) et *HmCalR* (*calreticulin receptor*). Ils semblent être exprimés sur des populations microgliales distinctes [28,35].

L'homologie qui existe entre la sangsue et les mammifères concernant l'activation microgliales et les facteurs chimioattractants qui interviennent dans le recrutement, ainsi que l'accessibilité de la chaîne nerveuse, sont des éléments qui font de *H. medicinalis* un modèle intéressant pour l'étude de la microglie.

En outre, des observations en microscopie confocale de neurones en co-culture avec des cellules microgliales, montrent que la croissance neuritique *in vitro* s'accompagne d'une sécrétion très importante de vésicules extracellulaires (VEs) [36]. De plus, une culture de neurones seuls révèle un nombre réduit de VEs libérées dans le milieu de culture, ce qui suggère fortement une origine microgliale de ces vésicules ou le besoin d'une co-culture pour une sécrétion stimulée.

1.2 Les vésicules extracellulaires

L'une des bases du maintien de l'homéostasie cellulaire passe par la communication intercellulaire. Celle-ci regroupe l'ensemble des messages qui partent d'une cellule émettrice vers une cellule réceptrice. A noter que les rôles émetteurs et receveurs peuvent être assurés par la même cellule, dans une configuration de boucle d'autorégulation. Qu'ils soient émis en conditions physiologiques ou pathologiques, après réception et transduction ces signaux ont un impact sur les cellules receveuses. Les mécanismes de communication cellulaire peuvent être médiés par contact direct de cellule à cellule ou par transfert de molécules secrétées (e.g. hormones, cytokine, facteurs de croissance et neurotransmetteurs. Ces deux dernières décennies, un nouveau mécanisme de communication a été décrit, basé sur le transfert d'informations *via* des vésicules extracellulaires (VEs) [37–39].

1.2.1 Historique

Les premiers travaux de recherche faisant référence aux VEs sont ceux de Wolf en 1967 [40]. Il décrivait la présence de granules denses aux électrons provenant de plaquettes fraîchement isolées de sang citraté, qu'il qualifia à l'époque de "poussière plaquettaire" de l'anglais "platelet dust" (figure 4).

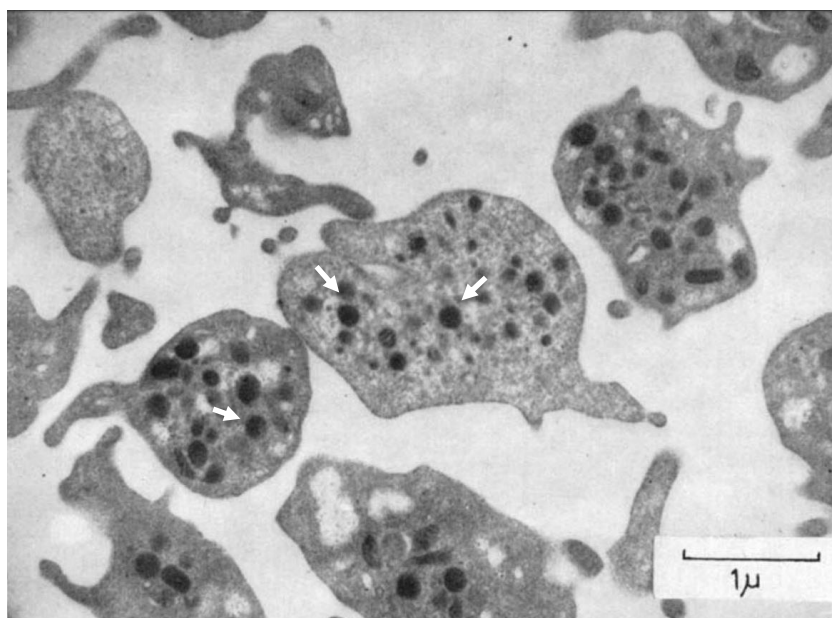


Figure 4 : Coupe de plaquettes intactes faite immédiatement après la séparation du sang citraté frais. Noter la présence de particules denses aux électrons (flèches) qui semblent être des poussières plaquettaires. (Réimprimé avec permission, de [40])

Introduction

En 1975, Dalton [41] décrit des microvésicules dont la structure est similaire à celle de vésicules présentes dans les corps multivésiculaires (CMVs). Son étude portait sur la comparaison entre les microvésicules libérées en culture par les cellules lymphocytaires FL-74 et celles présentes dans le sérum de veau fœtal commercial. Il conclut que les vésicules de CMVs et les microvésicules extracellulaires ont une ultrastructure similaire, mais qu'il n'a pas de preuves concrètes d'une origine commune.

En 1981, Trams fut le premier à utiliser le terme « exosomes », pour décrire un large panel de vésicules dont la taille allait de 40 nm à 1 µm. Ces vésicules provenaient de différentes lignées cellulaires à phénotype normal et néoplasique [42]. Dans son étude il met en évidence une activité 5' nucléotidase de ces vésicules « exfoliées » de la membrane plasmique. Pour justifier de cette origine, l'auteur s'est appuyé sur la richesse lipidique des vésicules notamment en sphingomyéline et acides gras polyinsaturés, suggérant un rôle physiologique pour ces structures.

En 1983, deux équipes ont rapporté quasi simultanément que les récepteurs à la transferrine dans les réticulocytes, sont associés à de petites vésicules d'environ 50 nm qui sont littéralement relarguées par ces cellules dans l'espace extracellulaire [43] [44].

Plus tard en 1987, Johnstone [45] découvre que, l'élimination des récepteurs membranaires des réticulocytes passe par la voie endosomale avec formation de vésicules intraluminales (VILs) dans l'endosome, puis fusion des CMVs avec la membrane plasmique et relargage extracellulaire de ces VILs. Elle reprend le terme « exosomes » utilisé auparavant par Trams [42], mais cette fois pour décrire ces VILs libérées. Le terme « exosome » restera utilisé pour se référer à des vésicules d'origine endosomale.

Une décennie plus tard, l'intérêt des vésicules s'intensifie dans le domaine de l'immunologie. En effet, en 1996, l'équipe de Raposo démontre que les lymphocytes B libèrent des exosomes contenant le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH-II). Ce relargage intervient après fusion des CMVs avec la membrane plasmique. Ces exosomes ont alors la capacité de présenter le complexe peptidique CMH-II et de ce fait d'activer les cellules T [46].

Rapidement en 1998, Zitvogel met en évidence la production d'exosomes par les cellules dendritiques (figure 5) [47], suivi par Théry qui confirme cette production [48]. L'une des fonctions des exosomes mise en évidence en 2002 est l'activation des lymphocytes T [49].

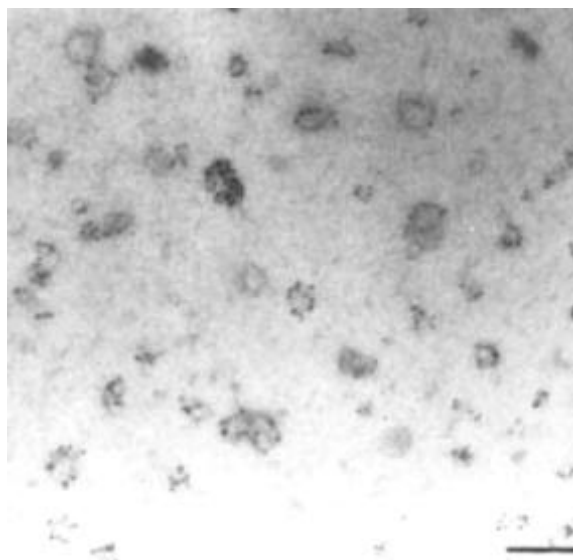


Figure 5 : Microscopie électronique d'exosomes de cellules dendritiques immunomarqués. Les préparations d'exosomes contiennent de petites vésicules de 50 à 90 nm marquées avec un anticorps anti-CD63, une tetraspanine présente à la surface des vésicules. Barres: 250 nm. (Réimprimé avec permission, de [47]). Copyright 1998 Nature Publishing Group.

En 2007, Valadi et ses collègues relancent l'intérêt de la recherche sur les vésicules extracellulaires en démontrant pour la première fois, la présence d'acide ribonucléique messager (ARNm) et de microARN (mi-ARN) dans les exosomes isolés à partir de mastocytes murins et humains, mais également dans les cellules cibles, où ils sont biologiquement actifs [37].

En 2011, la Société Internationale des Vésicules Extracellulaire (ISEV) est fondée avec comme président Jan Lötvall. Le premier congrès international de la société a eu lieu en 2012, à l'Université de Göteborg, Suède [50]. Un de ses accomplissements a été la mise en place d'un journal dédié à la recherche sur les vésicules extracellulaires (JEV : *Journal of Extracellular Vesicles*). Le journal compte à ce jour 7 volumes. Le facteur d'impact sera bientôt déterminé, mais le journal fait référence dans le domaine de la recherche sur les VEs par son facteur de citation (20.23 pour l'année 2017 d'après Scopus CiteScore).

Actuellement, la société compte plus de 1000 membres et des Sociétés Nationales ont été également créées. La Société Française des Vésicules Extracellulaires (FSEV) a été officiellement fondée le 21 Avril 2018.

1.2.2 Nomenclature

Au fil des années, une grande confusion s'est installée dans la nomenclature des vésicules extracellulaires [51]. Souvent, les vésicules sont nommées en fonction des cellules ou tissus dont elles dérivent. Ainsi, on trouve des termes comme prostasomes (vésicules dérivant de prostate) [52,53] ou oncosomes (vésicules issues de cellules cancéreuses) [54,55].

Quand la nomenclature est basée sur l'origine cellulaire, des termes comme exosomes (vésicules endosomales) [56], ectosomes (vésicules issues du bourgeonnement membranaire) [39] ou encore corps apoptotiques (vésicules formées suite à la mort cellulaire) [57] sont alors utilisés.

Des synonymes sont aussi très communément utilisés : l'exemple des ectosomes étant le plus marquant. En effet, ectosomes [58] microvésicules [39], microparticules [59,60] et vésicules excrétées (*shedding vesicles*) renvoient tous au même type vésiculaire, à savoir celles issues d'un bourgeonnement membranaire.

Cependant, ces termes ne fournissent généralement aucune information sur le type vésiculaire auquel ils renvoient et encore moins sur l'origine cellulaire qui leur a donnée naissance.

Basé sur leurs tailles, les vésicules extracellulaires se divisent en trois catégories: i) exosomes compris entre 30-100 nm, proche de celle du virus, ii) microvésicules, considérées comme plus grande, plutôt proche de la taille d'une bactérie et d'un diamètre compris entre 100-1000 nm et iii) corps apoptotiques, d'une taille comprise entre 1 μ m et 5 μ m d'un ordre de grandeur proche de celui des plaquettes [57] (figure 6).

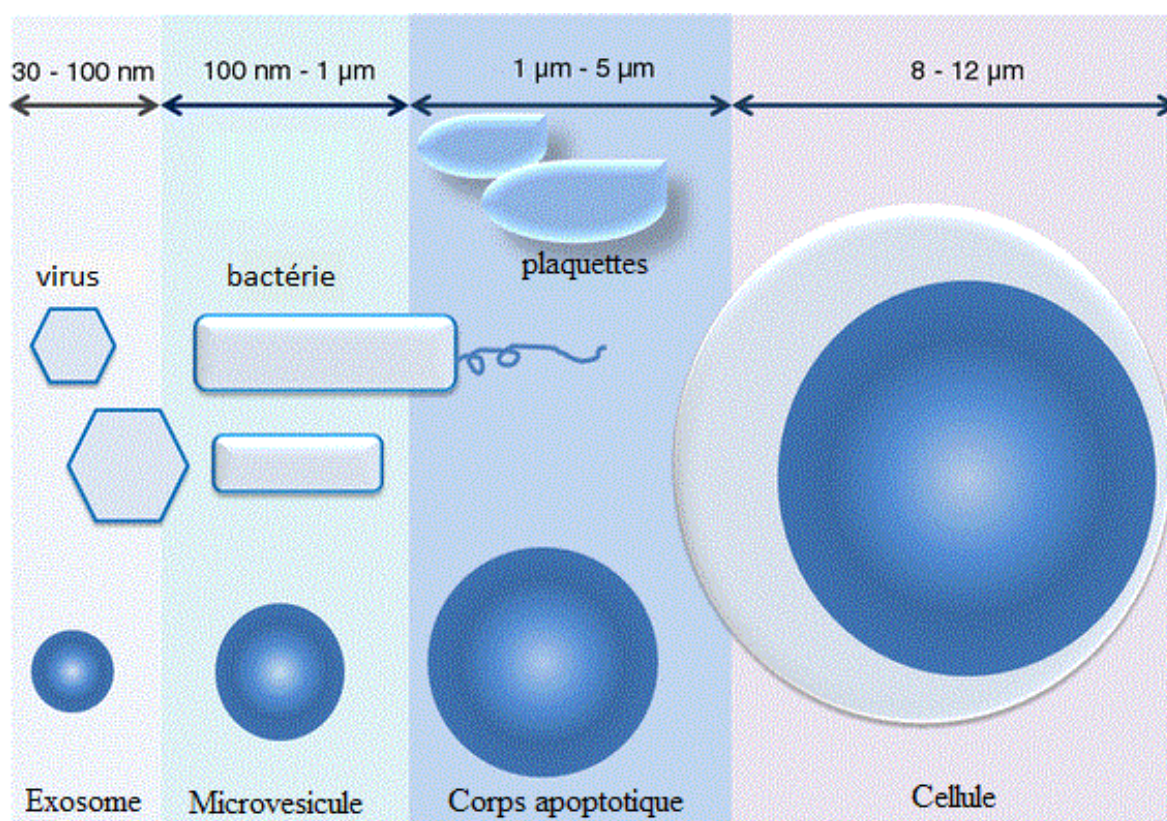


Figure 6 : Gamme de taille des principaux types de vésicules membranaires. Les exosomes partagent une distribution de taille avec les virus, les microvésicules se chevauchent avec les bactéries, alors que les corps apoptotiques et les plaquettes ont une taille comprise entre 1 et 5 μm . (Adapté et réimprimé avec permission, de [57]). Copyright the Author(s) 2011.

La communauté internationale *via* les publications dites de prise de position « ISEV position papers » [61,62] travaille à mettre en place une standardisation de la nomenclature mais également à établir des règles de rigueur expérimentale quant à l'étude des VEs. Il est difficile d'envisager une séparation des VEs basée sur leur taille car les différentes catégories ont des tailles chevauchantes [63]. D'autre part, des marqueurs moléculaires spécifiques de différentes catégories sont à ce jour inconnus, et donc une séparation basée sur un piégeage moléculaire semble impossible [64]. C'est pour l'ensemble de ces raisons, et pour limiter la confusion, que le terme « vésicules extracellulaires » plus générique sera utilisé dans le présent manuscrit.

1.2.3 Biogenèse des vésicules extracellulaires

L'intérêt du projet de thèse s'inscrit sur l'effet bénéfique potentiel des vésicules extracellulaires dans l'induction de la croissance neuritique. C'est dans ce contexte que les corps apoptotiques, étant majoritairement des véhicules de facteurs de mort cellulaire [57], ne représentent pas un intérêt pour notre étude.

1.2.3.1 La voie endosomale (les exosomes)

Les exosomes sont des vésicules libérées dans le milieu extracellulaire suite au phénomène cellulaire d'exocytose. Leur taille varie entre 30-100 nm et peut atteindre 150 nm selon certains auteurs [56]. Avant d'être sécrétés, les exosomes passent par une étape de « tri ». En effet, ils sont soit dégradés dans le lysosome soit adressés à la membrane plasmique pour être sécrétés dans le milieu extracellulaire [65].

Les vésicules extracellulaires dites exosomes sont d'abord générées sous forme de vésicules intraluminales (VILs) dans la lumière de l'endosome [66]. La maturation de l'endosome précoce en endosome tardif se traduit par la formation d'endosomes multivésiculaires ou corps multivésiculaires [65,67]. Cette maturation est possible notamment par les transitions des protéines RAB-GTPase (*Ras-Related in Brain-Guanosyl tri-phosphatase*) RAB 5/RAB 7 [68]. La surexpression de Q75L, un mutant de RAB 5, induit une fusion des endosomes précoces, ceci se traduit par leur taille qui croît significativement [69]. Cependant, ce phénomène n'empêche pas la formation de VILs. Dans d'autres études sur les cellules Hela [70] et les cellules MCF7 (lignée mammaire cancéreuse) [71], où RAB 5 et RAB 7 respectivement, ont été déplétés, la sécrétion des exosomes est modulée. La fonction de ces deux protéines GTPase tendrait plus vers le maintien de l'homéostasie des endosomes qu'une action directe dans la biogenèse des exosomes.

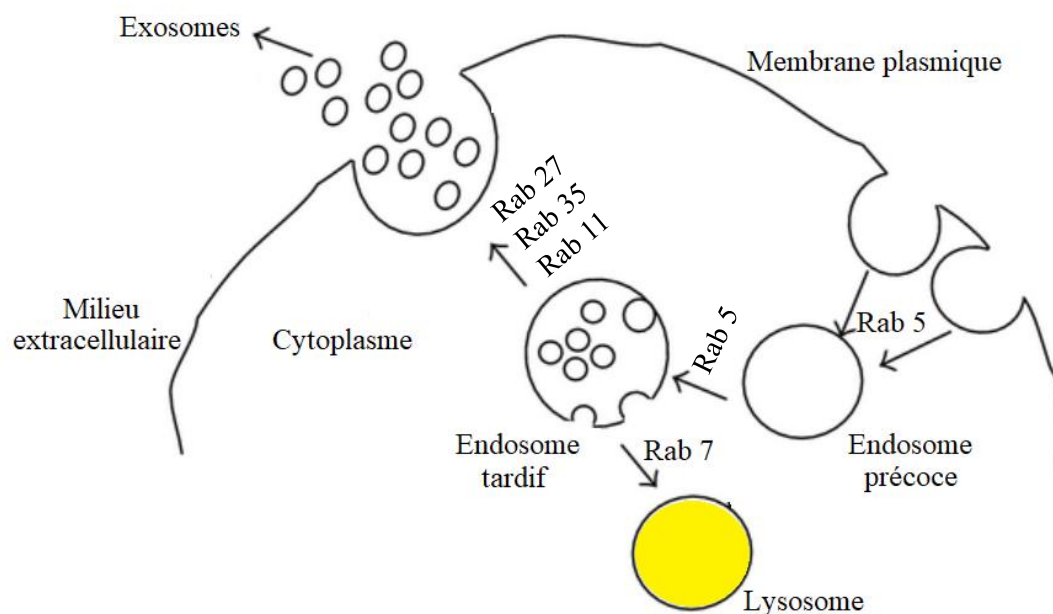


Figure 7 : Description schématique du trafic vésiculaire et de sa régulation par les GTPases RAB. Les protéines RAB 5 interviennent dans la maturation de l'endosome précoce vers l'endosome tardif, alors que RAB 7 favoriserait plus une orientation vers la voie de dégradation lysosomale.

1.2.3.1.1 Biogenèse ESCRT dépendante

Mise en évidence chez la levure, la machinerie ESCRT, pour *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*, est le premier mécanisme décrit comme induisant la formation des VILs et par la suite des CMVs [72]. ESCRT est un complexe formé de quatre sous-complexes ESCRT-0 [73,74], ESCRT-I [75], ESCRT-II [76] et ESCRT-III [77] qui peuvent être associées à des protéines comme VPS4 (*Vacuolar Protein Sorting-associated protein 4*), ALIX (*Apoptosis-Linked gene 2-Interacting protein X*), VTA-1 (*Vps Twenty Associated 1*) et ATPase (*Adenosin TriPhosphatase*) [78] (figure 8).

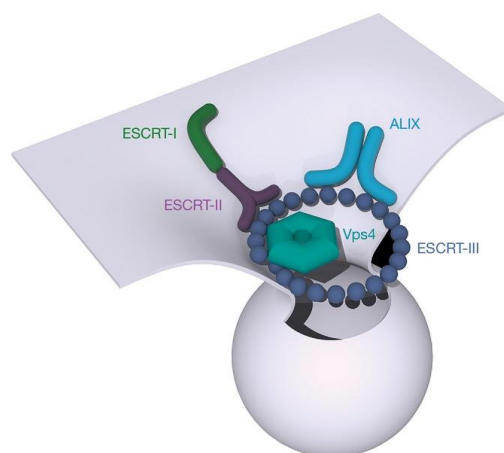


Figure 8 : Représentation du complexe ESCRT. Les branches ESCRT-I / ESCRT-II et ALIX de la voie ESCRT sont illustrées dans le contexte d'un col de bourgeon de vésicule générique. Elles apparaissent sur la face externe du col de bourgeonnement liée à ESCRT-III (Réimprimé avec permission, de [78]). Copyright 2015 The Author.

Afin d'expliquer le mécanisme d'action de ce complexe, de multiples modèles ont été proposés sur la base d'observations contradictoires, ceci s'explique par le fait que ces modèles sont type cellulaire et organisme dépendents.

De manière générale, ces différents sous-complexes agissent de manière séquentielle :

ESCRT 0 est constitué des deux sous unités HRS (*Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Regulated tyrosine kinase Substrate*) -VPS27 chez la levure- et de STAM pour *Signal-Transducing Adaptor Molécule*. ESCRT 0 est recruté à la limite de la membrane endosomale en interagissant avec le phospholipide PI₃P (Phosphinositol-3-phosphate) présent dans la membrane des endosomes. Cette interaction permet de stabiliser l'amarrage des complexes ESCRT. Les deux sous-unités formant ESCRT 0 ont également la faculté de reconnaître l'ubiquitine orientée coté cytoplasmique et portée par le domaine transmembranaire du cargo à emballer [72].

ESCRT 0 recrute ESCRT I par le biais de la liaison entre les sous unités HRS-TSG 101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*) -Vps23 chez la levure.

Ensemble, ESCRT 0 et ESCRT I regroupent en microdomaines les cargos ubiquitinylés, sous un manteau de clathrine. Un revêtement important pour limiter la diffusion du cargo, mais aussi dans l'adressage des vésicules vers des voies alternatives comme le transport rétrograde (du RE vers le Golgi) et les mécanismes de recyclage.

ESCRT I recrute ESCRT II, qui à son tour recrute le complexe ESCRT III formé de CHMP6 (*CHarged Multivesicular body Protein 6*) -Vps20 chez la levure- au niveau du col du bourgeon membranaire. Ce dernier s'attache à SNF 7 (*Solute carrier family 6 member 7*) -Vps32- pour favoriser la fission de la membrane du bourgeon de l'intérieur. Ce complexe a également pour

Introduction

fonction le recrutement des enzymes déubiquitine, permettant d'éliminer les résidus d'ubiquitine du cargo. Des protéines ubiquitylées ont parfois été retrouvées dans les exosomes [79], indiquant que la déubiquitylation est une étape optionnelle et non critique pour la formation des VILs. ESCRT III est ensuite dissocié et recyclé par l'action de l'ATPase VPS4, recrutée à la membrane endosomale suite à sa liaison avec CHMP2 [80] et CHMP3 [81] (figure 9).

Une inactivation de la machinerie ESCRT induit un dérèglement de l'efficacité de libération des exosomes ainsi qu'un changement au niveau de la nature du cargo. Cependant, ceci n'empêche pas la formation des VILs malgré des changements morphologiques importants de l'endosome [82]. Ces conclusions laissent penser à l'existence d'autres voies de compensation lors de biogénèse et ce indépendamment de la machinerie ESCRT.

Dans les réticulocytes, le récepteur à la transferrine est généralement adressé à la sécrétion *via* des exosomes par l'interaction avec ALIX [83]. Cette dernière, est une protéine du sous-complexe ESCRT III faisant parti du protéome des exosomes. Elle a été montrée comme se liant à l'extrémité N-terminale de la syntenine. Cette liaison a été décrite comme impliquée dans la biogénèse et le tri exosomal du syndécan [71,84].

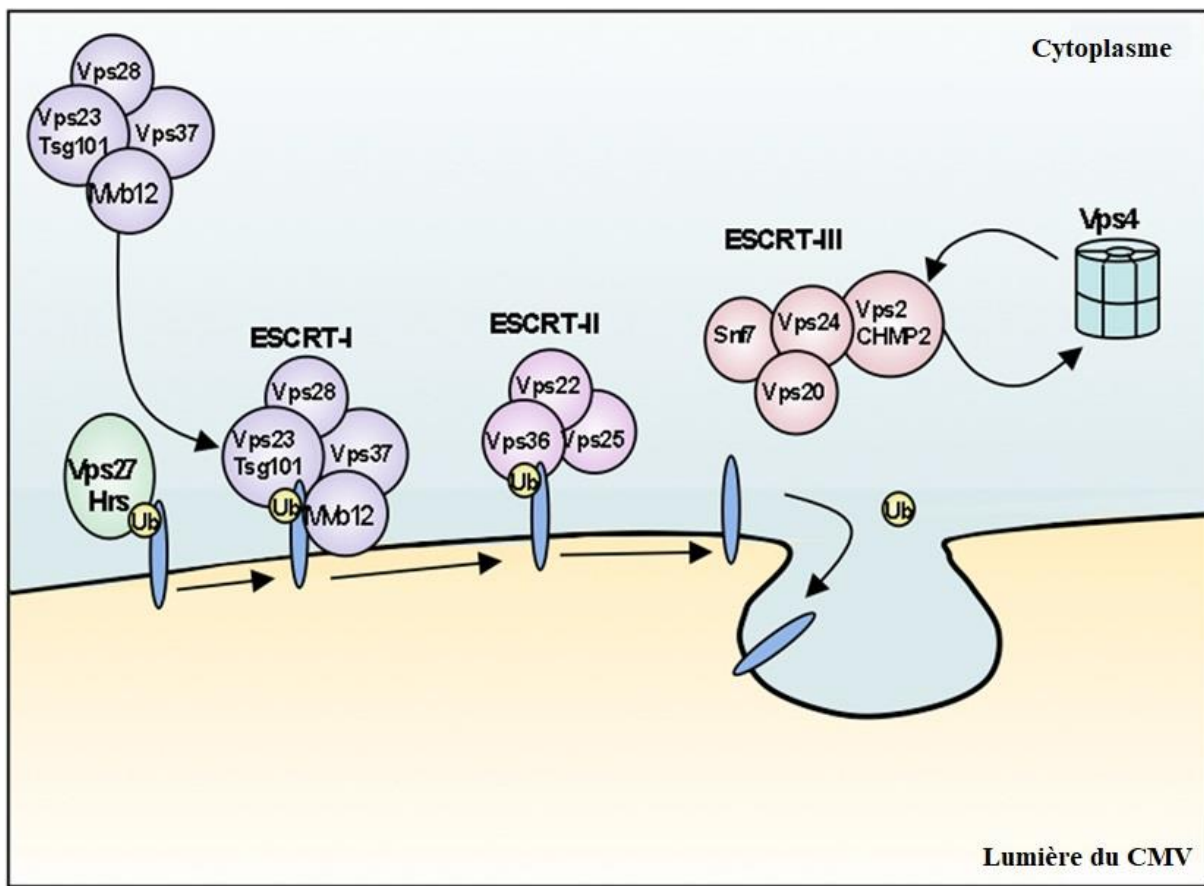


Figure 9 : Modèle de tri des protéines dépendant de l'ubiquitine par la machinerie ESCRT. Le complexe ESCRT est composé de : ESCRT 0, I, II et III agissant de manière séquentielle pour trier la cargaison ubiquitinée (Ub). Le complexe VPS27/Hrs-Hse1/STAM (ESCRT-0) est recruté au niveau de la membrane des endosomes en liant PI(3)P et les cargos ubiquitinés. ESCRT-0 recrute ensuite ESCRT-I (composé de TSG101/VPS23-VPS28-VPS37) à la membrane, où ESCRT-I interagit avec les cargaisons ubiquitinées *via* sa sous-unité VPS23. Ensuite, ESCRT-I recrute ESCRT-II (composé de VPS22/Eap30-VPS25/Eap25-VPS36/Eap45), qui à son tour initie l'oligomérisation du complexe ESCRT-III (composé de VPS2/CHMP2-VPS20/CHMP6-VPS24/CHMP3-Snf7/VPS32/CHMP4). ESCRT-I et II initient l'invagination de la membrane endosomale limitante. Les enzymes de désubiquitination ESCRT-III assurent la dissociation des résidus d'ubiquitine des molécules avant leur séquestration dans les CMVs. Enfin, ESCRT-III recrute des facteurs supplémentaires tels que Bro1 et l'ATPase VPS4. Bro1 recrutera une enzyme de deubiquitination alors que l'ATPase VPS4 travaillera à la séparation des complexes ESCRT-III et son recyclage. (Adapté et réimprimé avec permission, de [85]). Copyright 2012 the author (s).

1.2.3.1.2 Biogenèse ESCRT Independent

1.2.3.1.2.1 Voie lipidique

La production d'exosomes peut passer par la voie des céramides, basée sur l'hydrolyse de la sphingomyéline par nSMase1 (*neutral SphingoMyelinase-1*). Ce phénomène est décrit par Trajkovic et collègues [86] observant une diminution de la production d'exosomes par les cellules Oli-neu quand l'enzyme nSMase1 est inhibée ou déplétée par utilisation d'acides ribonucléiques interférents (ARNi). Cette diminution s'accompagne d'une réduction de la formation des VILs. Ce qui suggère que dans les cellules Oli-neu non traitées où l'enzyme nSMase1 est effective, la formation des vésicules peut passer par l'invagination spontanée de la membrane.

De la même manière, les phosphoinositides PI₃P et PI₂P inhibent la voie PI₃K/AKT [87,88] et PIKfyve [89] impliqués dans les mécanismes de macroautophagie [90] et de ce fait favorisent une orientation vers le processus de microautophagie impliquée dans la biogénèse des exosomes [91].

1.2.3.1.2.2 Voie des tétraspanines

Les vésicules extracellulaires sont fortement enrichies en tétraspanines. Les protéines de cette superfamille peuvent s'organiser en microdomaines membranaires enrichis en tétraspanines. et ont la faculté d'interagir avec de nombreuses protéines de signalisation cytosoliques et transmembranaires [92]. De manière intéressante en l'absence d'ESCRT, les CMVs et par la suite les exosomes continuent à être formés. Les vésicules générées sont alors très enrichies en CD63 [82]. L'exemple du CMH-II illustre parfaitement ce cas de figure. En effet, l'empaquetage du CMH-II dans les exosomes est indépendant de son ubiquitinylation et donc de la machinerie ESCRT, mais dépend de son incorporation dans les microdomaines riches en CD9 [93]. D'autres part, des études sur la mélanogenèse ont montré que les cellules de mammifères ont des voies de biogenèse des CMVs indépendantes des céramides ainsi que de la machinerie ESCRT, mais impliquent les tétraspanines CD63. Les CD63 sont plus localisées dans les endosomes et lysosomes tardifs. Ces tétraspanines sont probablement impliquées dans la formation de ces compartiments. Des déficiences lysosomales ne sont pas détectées chez les souris CD63 knock-out, cependant elles abritent des organites liés aux lysosomes altérés [66]. Dans les cellules HeLa déplétées en HRS (ESCRT0), le CD63 est nécessaire à la génération des VILs [94]. La protéine virale LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*) recrute CD63 dans les CMVs à faible teneur en cholestérol pour échapper à la dégradation dans les lysosomes.

LMP1 est alors sécrétée abondamment et rapidement *via* les exosomes, ce qui semble atténuer la signalisation NF- κ B dépendante de la molécule LMP1 [95].

L'invalidation génique de CD9 dans les cellules dendritiques de la moelle osseuse de souris, réduit la libération d'exosomes par rapport aux cellules dendritiques de type sauvage [96]. Par contre une absence de tétraspanines CD81 dans des lymphocytes n'affecte pas la libération d'exosomes [97]. Dans un modèle de cancer du sein chez la souris, la libération par les fibroblastes de WNT 11 (*Wingless-type MMTV iNTEGRation site family*) sécrété dans des exosomes est dépendante de la présence de CD81 [98]. De tous ces résultats, il semblerait que les mécanismes d'implication des tétraspanines dans la biogenèse des exosomes dans les CMVs, soit dépendent du type cellulaire et de l'organisme.

La machinerie ESCRT-indépendante et les mécanismes ESCRT semi-dépendants, comme la voie Alix/Syndécan/Synténine[71], semblent être plutôt impliqués dans l'excrétion des VILs sous forme d'exosomes cependant la voie dépendante de la machinerie ESCRT semble plus favoriser la dégradation après fusion avec le lysosome.

1.2.3.1.3 Tri des CMV : balance entre dégradation et sécrétion

A la différence des microvésicules dont la formation nécessite la présence du cargo au niveau de la membrane plasmique. La formation des exosomes passe par la voie endosomale. Le tri permet d'orienter les CMVs vers la voie de dégradation lysosomale ou vers un adressage à la membrane plasmique. La fusion des membranes des CMVs avec la membrane plasmique permet la libération des VILs sous forme d'exosomes dans l'espace extracellulaire. Un nombre d'étapes plus important pour la libération des exosomes suggère que leur adressage prenne plus de temps par rapport à celui des microvésicules.

Les mécanismes qui régissent le destin des corps multivésiculaires pour aller soit vers la voie de dégradation ou soit vers la voie d'excrétion sont encore mal connus. Plusieurs études rapportent que l'inhibition de l'une des deux voies favoriserait l'autre. En effet, l'inhibition de l'activité lysosomale par des agents alcalins, augmente de manière significative la sécrétion de vésicules extracellulaires.

Dans des études sur la maladie d'Alzheimer, l'utilisation de la chloroquine sur des cellules SH-SY5Y induit une augmentation de la sécrétion d'exosomes contenant la protéine précurseur du peptide β amyloïde [85]. La chloroquine est un agent lysosomotrope qui empêche l'acidification endosomale [99]. Son accumulation dans le compartiment lysosomale inhibe les enzymes qui

Introduction

s'y trouvent et empêche la fusion de l'endosome avec le lysosome. Cet agent a également la capacité de limiter l'autophagie, car l'augmentation du pH lysosomal, inhibe la fusion avec l'autophagosome [100]. Il a également été rapporté pour la protéine associée aux microtubules Tau qu'une mutation induisant l'inhibition des lysosomes est accompagnée d'une augmentation de la présence de protéines Tau dans les VEs [101].

Les RAB sont des petites GTPases dont la taille est comprise entre 20 et 25 kDa. Les protéines RAB sont retrouvées sous deux états. L'état activé (état "on") en présence de GTP (Guanosine Tri-Phosphate) et l'état inactivé (état "off") après hydrolyse du GTP en GDP (Guanosine Di-Phosphate). Les protéines RAB GTPases sont des régulateurs clés du trafic cellulaire. Plus de 70 protéines de type RAB ont été identifiées dans les cellules humaines et leurs membranes. De manière intéressante, ces membres de la famille RAB sont localisés dans des compartiments intracellulaires distincts [102].

L'orientation des CMVs vers la dégradation lysosomale se fait le long des microtubules par des mécanismes de transport rétrograde, ce qui implique l'intervention de la protéine RAB 7 et d'un moteur moléculaire, la dynéine. RAB 7 est une Ras GTPase à multiples facettes. En effet, RAB 7 peut déclencher la machinerie d'orientation des CMVs vers la dégradation lysosomale [103,104] et de manière étonnante est impliquée dans la sécrétion d'exosomes [71]. L'une des pistes pour expliquer l'une ou l'autre activité, réside dans les modifications post traductionnelles portées par RAB 7. L'ubiquitinylation de RAB 7 favorise le déclenchement de la voie de dégradation des CMVs par le lysosome et sa non ubiquitinylation conduit à leur sécrétion sous forme d'exosomes. Dans ce contexte, la parkine -une E3 ubiquitine ligase- joue un rôle dans l'organisation des voies endosomale et endo-lysosomale [105]. A noter que la composition lipidique des VILs oriente également le tri des CMVs par RAB 7. En effet des VILs présentant une faible teneur en cholestérol, favorise la dégradation des CMVs par la voie lysosomale [106] (figure 10). Ces résultats mettent donc en avant la capacité des exosomes à être un moyen rapide de communication cellulaire et de propagation de facteurs pathologiques comme par exemple l' α -synucléine [107] Même si tous les mécanismes ne sont pas découverts, cette libération accrue fait suite à une accumulation de l' α -synucléine cytosolique. La voie lysosomale permettrait d'éliminer efficacement ce genre de protéines dans un contexte pathologique *via* RAB 7.

Introduction

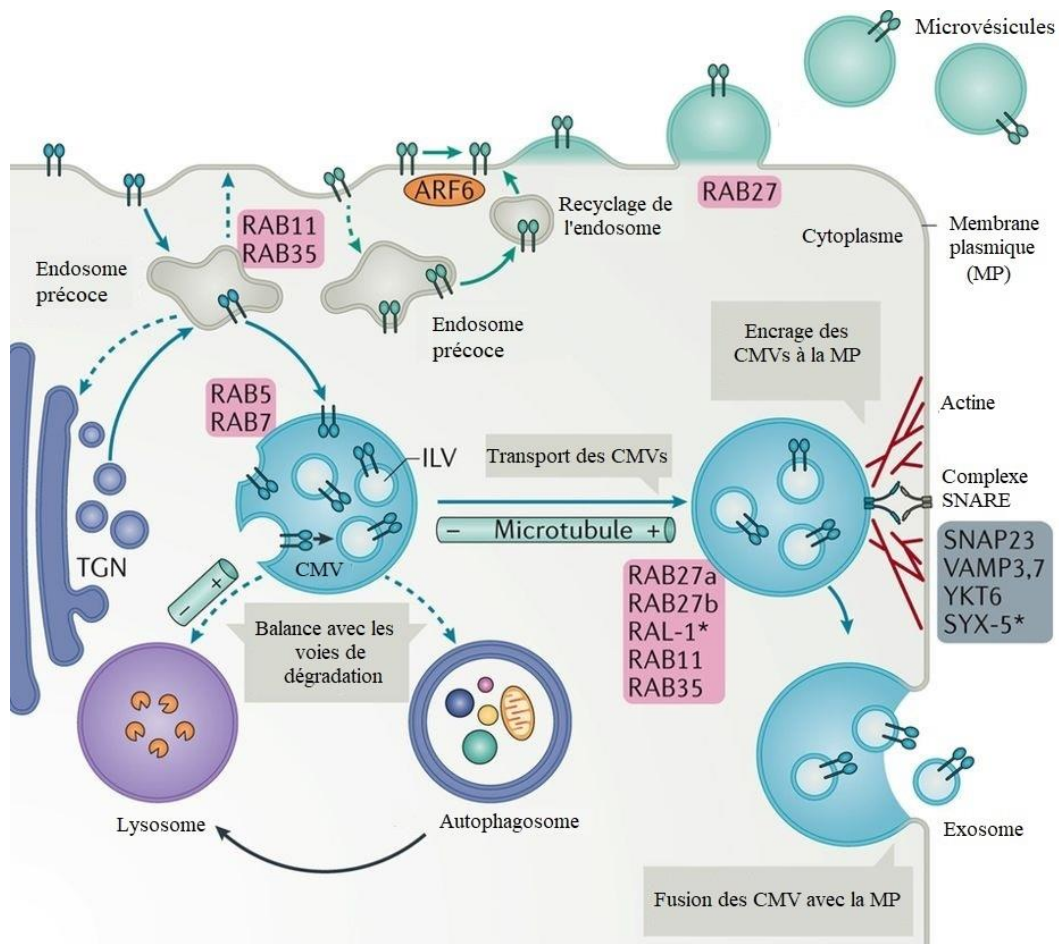


Figure 10 : Interdépendance des voies de trafic intracellulaire dans la formation de vésicules extracellulaires. La formation d'exosomes (flèches bleues) et de microvésicules (flèches vertes) nécessite une régulation adaptée de plusieurs étapes de trafic intracellulaire qui influent sur le site de biogenèse des vésicules extracellulaires et, pour les exosomes, sur le destin des corps multivésiculaires (CMVs). Les cargaisons dans les CMVs proviennent d'une endocytose au niveau de la membrane plasmique ou directement sur les membranes des CMVs ou encore *via* la voie de biosynthèse du *trans-Golgi-network* (TGN), par les endosomes de tri précoce. Le transport rétrograde vers le TGN ou le recyclage vers la membrane plasmique détournera les cargaisons de leur adressage vers le CMV (flèches en pointillés) et, par conséquent, leur incorporation dans des vésicules intraluminales (VILs). Ces processus de tri sont régulés par diverses protéines GTPases apparentées à RAS (RAB). Une fois maturés, les CMVs qui ne sont pas adressés vers les lysosomes ou les autophagosomes en vue de leur dégradation, sont transportés par les microtubules vers la membrane plasmique. À ce stade, l'amarrage et la fusion sont les deux processus finaux nécessaires à la libération de l'exosome. Les protéines RAB, actine et SNARE sont impliquées dans ces étapes de libération des exosomes. Dans le cas de la biogenèse des microvésicules, l'endocytose (flèche pointillée) et le recyclage vont respectivement diminuer et augmenter l'adressage des cargaisons membranaires *via* les microvésicules. Il est à noter que la libération d'exosomes nécessite des étapes de transport, d'attachement et de fusion du CMV étroitement régulées à la membrane plasmique (en dehors du tri des cargaisons), ce qui pourrait expliquer la différence de temps entre la formation et la libération des deux types de vésicules extracellulaires. ARF6= *ADP-ribosylation factor 6*; RAL-1= *Ras-related GTPase*; SNAP23= *SyNaptosomal-Associated Protein 23*; SYX-5= *SYntaXin 5*; VAMP3= *Vesicle-Associated Membrane Protein*, * = protéine *Caenorhabditis elegans*. (Adapté et réimprimé avec permission, de [103]). Copyright 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature.

1.2.3.1.4 Transport, ancrage membranaire

Une fois le tri et la destination finale des CMVs déterminés, les exosomes destinés à l'excrétion sont adressées à la membrane plasmique. Plusieurs étapes et mécanismes, ont été rapportés qui impliquent des moteurs moléculaires dans le transport antérograde comme la kinésine, des protéines du cytosquelette (microtubule, actine) ainsi que des protéines de la famille RAS-GTPase (RABs) et SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*).

L'étude des mécanismes de fusion des CMVs et de libération d'exosomes par les cellules K562 -lignée de cellules érythrocytaires humaine- a montré que Rab 11 a un effet régulateur dans le recyclage du récepteur à la transferrine (RTf) qui est calcium dépendante [108,109]. En effet, par des techniques d'invalidation géniques, en générant des mutations ponctuelles, les cellules transfectées par Rab-sauvage ou Rab mutant (Rab11Q70L), montrent de larges CMVs Rab-GFP positifs [110]. Ces analyses montrent une diminution de l'expression du RTf à la surface cellulaire, qui s'explique par sa séquestration dans les compartiments intracellulaires et/ou sa perte *via* une sécrétion exosomale. Ces observations traduisent une implication de RAB 11 dans le trafic intracellulaire ainsi que dans la sécrétion exosomale.

RAB35 régule de manière accélérée l'endocytose et/ou le recyclage à la membrane plasmique de diverses protéines dont la transeferrine [68]. Les oligodendrocytes isolent les axones avec une gaine de myéline, ce qui fournit non seulement un support trophique protégeant ainsi du stress oxydatif [111], mais permet également une transmission plus rapide du signal. Dans le cadre de communication neurone-glie, les oligodendrocytes ont été testés pour leur capacité à sécréter des exosomes. L'une des voies du trafic intracellulaire qui est impliquée dans ce processus passe par RAB35 [112]. Dans la même étude, l'inhibition de RAB35, induit une accumulation de vésicules endosomales et une diminution de la sécrétion exosomale. Ces faits posent la base pour un système de communication cellulaire médiée par des vésicules extracellulaires dans le système nerveux. Cependant, la certitude physiologique d'une telle transmission entre oligodendrocytes et neurones est opposée au fait que la microglie -plus que les astrocytes, oligodendrocytes et neurones- est montrée comme cible préférentielle des exosomes libérés par les oligodendrocytes qu'elle internalise par macropinocytose [113].

RAB27, présente sous deux isoformes (RAB27a et RAB27b) est tout aussi importante dans la sécrétion d'exosomes. Avec ses effecteurs, les protéines Synaptogamine-like 4 (Slp4) et

l'exophiline 5 (Slac2b), ils interviennent dans l'ancrage à la membrane (*docking step*), la dernière étape du trafic des CMVs [70,103] avant exocytose.

Dans les cellules HeLa, l'inhibition de RAB27a et RAB27b induit une diminution de l'amarrage des CMVs à la membrane [70]. A noter que RAB 27b n'est pas retrouvée de manière constitutive dans tous les types cellulaires. En effet, dans les mélanocytes et les lymphocytes cytotoxiques on retrouve uniquement RAB27a alors que dans les plaquettes les deux isoformes sont présentes [68]. Ceci traduit la diversité de la machinerie d'excrétion d'exosomes dépendamment du type cellulaire.

Tous les mécanismes ne sont pas encore connus, par exemple on n'explique pas comment certains CMVs sont dirigés vers la dégradation et d'autres vers la sécrétion. Des notions de « *priming* » de CMVs commencent à voir le jour, poussant de plus en plus à renforcer l'idée que les CMVs capable de contenir des exosomes pourraient être considérés comme des compartiments spécialisés et non pas juste des sous-types de CMVs [103] (figure 10).

1.2.3.1.5 Fusion et libération

L'étape finale pour l'excrétion des exosomes est la fusion des CMVs à la membrane plasmique et la libération des VILs sous forme d'exosomes.

Les SNAREs sont des complexes protéiques retrouvés au niveau des membranes cellulaires. Ils sont décrits comme éléments clés dans la fusion lors de toutes les étapes du trafic vésiculaire de la voie de sécrétion [114,115]. Structuellement, les SNAREs sont formés d'hélices qui interagissent en se regroupant en complexes *trans* à 4 hélices parallèles nommées SNAREpin [116]. La formation de ce complexe conduit à une connexion étroite des membranes destinées à fusionner [117]. Les v-SNARE (v pour *vesicle*) sont retrouvés au niveau des vésicules destinées à être sécrétées et sont également appelés R-SNARE. R en rapport avec l'acide aminé arginine qu'elles portent et qui se retrouve dans le cœur du complexe SNAREpin. Les t-SNARE (t pour *target*) sont retrouvés au niveau de la membrane réceptrice (e.g. endosomale, lysosomale, plasmique) [118] et sont également appelés Q-SNARE. Q en rapport avec les 3 acides aminés glutamine, qu'elles contiennent (Qa Qb et Qc) [119]. Une liaison hydrogène entre les acides aminés R et Q, permet un rapprochement de la vésicule et de la membrane cible. Afin de permettre leur recyclage et réutilisation dans d'autres événements de fusion, la protéine NSF (*N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein*) intervient pour désassembler le faisceau hélicoïdal SNAREpin [117].

Introduction

La protéine NSF appartient à une AAA+ (*ATPases Associated with various cellular Activities*), une superfamille de protéines avec un ou deux domaines de liaison aux nucléotides, formant souvent des oligomères en anneau et fonctionnant comme des protéines chaperonnes dans divers processus cellulaires. Elles ont la capacité de déplier des agrégats ou des structures compactes [120]. Fader et collaborateurs [121] ont montré qu'une R-SNARE, la protéine VAMP7 (*Vesicle-Associated Membrane Protein 7*), est nécessaire à la libération d'exosomes : dans la lignée cellulaire K562, la surexpression du domaine N-terminal de VAMP7, inhibe la formation du complexe SNARE. Cette inhibition est accompagnée de la formation de CMVs élargis, distribués à la périphérie cellulaire. L'altération de la fusion des MVB avec la membrane plasmique réduit ainsi la libération des exosomes.

D'autres articles sur la protéine YKT6 (*Synaptobrevin homolog YKT6*) -une protéine de la famille R-SNARE- ont montré que sa déplétion diminue le niveau de marqueurs comme TSG101 - protéine de la machinerie ESCRT- dans les exosomes sécrétés par les cellules HEK (*Human Embryonic Kidney cells*) 293 [122]. De même, dans la lignée de cellules embryonnaires Schneider 2 de drosophile, une déplétion de la syntaxine-1A, une Q-SNARE, est accompagnée d'une diminution de la libération de la protéine exosomale EVi (*EVenness interrupted*) [123]. Plus récemment, Wei et collègues ont montré que sur des cellules tumorales, le pyruvate kinase de type M2 (PKM2) permet la libération d'exosomes en phosphorylant la protéine SNAP-23 (partenaire des protéines VAMP et syntaxine) au niveau de son acide aminé serine en position 95. La substitution de la serine par une alanine induit une diminution significative de la sécrétion d'exosomes PKM2 dépendante [124]. D'autres travaux ont montré que la phosphorylation de la serine en position 110 de cette même protéine induit la libération d'exosome [125].

L'activité des complexes SNAREs est régulée par d'autres molécules, notamment la synaptotagmine, une protéine du trafic membranaire impliquée dans la libération des neurotransmetteurs en réponse à un flux calcique [103,126]. Elle porte deux domaines de liaison au calcium, qui interagissent à la fois avec les SNAREs et avec les phospholipides acides. De ce fait, il est probable que la synaptotagmine favorise la fusion médiée par les SNAREs qui la recruteraient lorsque la concentration en calcium est élevée [127].

1.2.3.2 Le bourgeonnement membranaire (ectosomes, microvésicules) : biogenèse et libération

Les microvésicules sont des vésicules hétérogènes qui bourgeonnent de la membrane plasmique. D'autres termes ont été utilisés pour nommer ces vésicules comme ectosomes [128], oncosomes [54] et microvésicules [39]. Elles sont excrétées à la surface d'une multitude de types cellulaires.

Au cours des dernières années, les chercheurs ont entrepris une démarche collective afin de décrypter leurs différents rôles dans la modification de l'environnement extracellulaire, la signalisation intercellulaire ou l'invasion cellulaire indépendante de la protéolyse de la matrice cellulaire [129,130]. Tout comme les exosomes, les microvésicules contiennent des cargoes biologiquement actifs. Elles sont de ce fait, capables de modifier l'état des cellules receveuses. On y retrouve de l'ADN [131], de l'ARNm et les miARN [132] ainsi que des protéines [133]. Ces cargoes sont impliqués dans une multitude de fonctions cellulaires allant de la transduction du signal, à l'adressage des vésicules ou à l'activation des cellules cibles (figure 11).

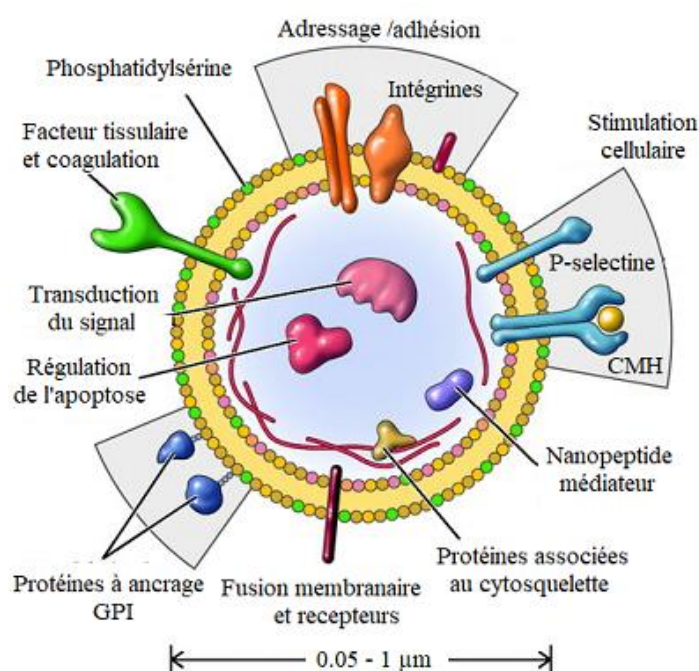


Figure 11 : Microparticules cellulaires : dissémination d'effecteurs bioactifs. Des microparticules sont libérées au niveau de la membrane plasmique de cellules stimulées. Elles emportent des protéines cytoplasmiques ainsi que des lipides bioactifs impliqués dans divers processus fondamentaux. Cette représentation ne prétend pas être exhaustive. CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; GPI= GlycosylPhosphatidylinositol. (Adapté et réimprimé, de [59]). Copyright 2005 International Union of Physiological Sciences/ The American Physiological Society.

Introduction

Contrairement aux exosomes qui sont issues de la voie endosomale [56,67], la biogenèse des microvésicules implique un trafic des cargaisons moléculaires vers la membrane plasmique, une redistribution des lipides membranaires et l'utilisation d'une machinerie contractile localisée au niveau de la membrane plasmique pour permettre le « pincement » et le bourgeonnement des vésicules [134]. Cependant, les microvésicules et les exosomes partagent de nombreux points communs [135]. D'abord un chevauchement dans les tailles. En effet, les plus petites microvésicules ont la taille d'exosomes de 100 nm bien qu'elles puissent atteindre un diamètre beaucoup plus important, de l'ordre du micromètre. De plus, les exosomes, comme les microvésicules, ont la capacité d'empaqueter des cargos de même nature, ce qui rend difficile la distinction des deux populations d'un point de vue marqueurs moléculaires [136].

Les mécanismes de biogénèse des microvésicules font également intervenir l'une des voies de formation des VILs dans l'endosome, à savoir la machinerie ESCRT. Chez *C. elegans*, il a été montré que l'inhibition de l'expression de VPS 4 inhibe la production d'ectosomes. L'interaction de la protéine-1 contenant le domaine arrestine ARRDC1 (*ARRestin Domain-Containing Protein 1*) avec le TSG 101, une protéine essentielle du complexe ESCRT induit la relocalisation du TSG101 des membranes endosomales vers la membrane plasmique entraînant probablement des modifications localisées au niveau de la membrane qui *in fine* permettent la libération des microvésicules [137]. Dans ce modèle, les microvésicules contiennent aussi bien du TSG 101 qu'ARRDC1 mais les marqueurs d'endosomes tardifs sont absents. Les microvésicules ARMMs (*Arrestin domain-containing protein 1 Mediated Microvesicles*) requièrent lors de leur formation la présence de VPS4 ATPase [138].

L'une des voies de bourgeonnement des microvésicules au niveau de la membrane plasmique de cellules cancéreuses dans l'environnement tumorale passe par l'activation d'ARF6 (*ADP-Ribosylation Factor 6*) [129]. En effet, pour permettre l'excrétion de microvésicules, l'activation de la phospholipase D dépendante d'ARF6 favorise le recrutement de la kinase ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) dans la membrane plasmique où elle phosphoryle et active MLCK (*Myosin Light-Chain Kinase*). La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine par MLCK est nécessaire pour la libération de microvésicules. En outre, l'activation d'ARF6 est inhibée par une phosphorylation par la PKC (*Phospho Kinase C*), de la chaîne légère de la myosine bloquant ainsi la libération des microvésicules. Ces observations traduisent un rôle central d'ARF6 dans la libération des microvésicules.

L'originalité de la formation des microvésicules réside également dans la dynamique membranaire et dans l'apport des lipides dans ce processus [139].

Chacun des deux feuilletts de la membrane plasmique a une composition lipidique spécifique. Les aminophospholipides [phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine] sont spécifiquement retrouvés dans le feuillet interne de la membrane plasmique, tandis que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont enrichies dans le feuillet externe [140]. La distribution lipidique dans l'espace intermédiaire et entre les feuilletts est régulée par trois acteurs majeurs : la flippase, la floppase et la scramblase. Les deux premières protéines sont des enzymes ATP dépendantes participant au maintien de l'asymétrie de la membrane en faisant passer des lipides du côté non cytosolique au côté cytosolique (flippase) et inversement (floppase). Le dernier acteur, la scramblase, est une enzyme dépendant du calcium et restaurant au contraire la répartition symétrique des lipides en facilitant leur mouvement bidirectionnel dans la bicouche. [59,141]. Dans les plaquettes, une forte augmentation du calcium intracellulaire [Ca^{++}] induit l'activation de la calpaïne protéase, qui clive les protéines cytosquelettiques et remodèle le cytosquelette [142]. De plus, une perte d'asymétrie membranaire due à la modulation des activités de la flippase, la floppase et la scramblase, cela conduit à la libération des microvésicules (figure 12).

Il existe un autre mécanisme permettant la formation de microvésicules suite à des interactions protéine-protéine. Une flexion de la membrane plasmique peut être initié par un encombrement de la périphérie cellulaire et des pressions latérales exercées par ces interactions protéine-protéine [143].

Dans ce chapitre nous avons constaté la difficulté à différencier les populations vésiculaires, ou encore décrit des mécanismes vésiculaires dans une lignée ou un organisme mais qui ne sont pas retrouvés dans d'autres. Les voies de trafic intracellulaire qui contrôlent la biogenèse des vésicules extracellulaires ne sont pas complètement élucidées. Toutefois, le domaine d'étude des vésicules extracellulaires connaît un intérêt grandissant dans la communauté scientifique et des découvertes pertinentes ont déjà fait leurs preuves tant *in vitro* qu'*in vivo* pour l'investigation de ces nanostructures biologiquement actives.

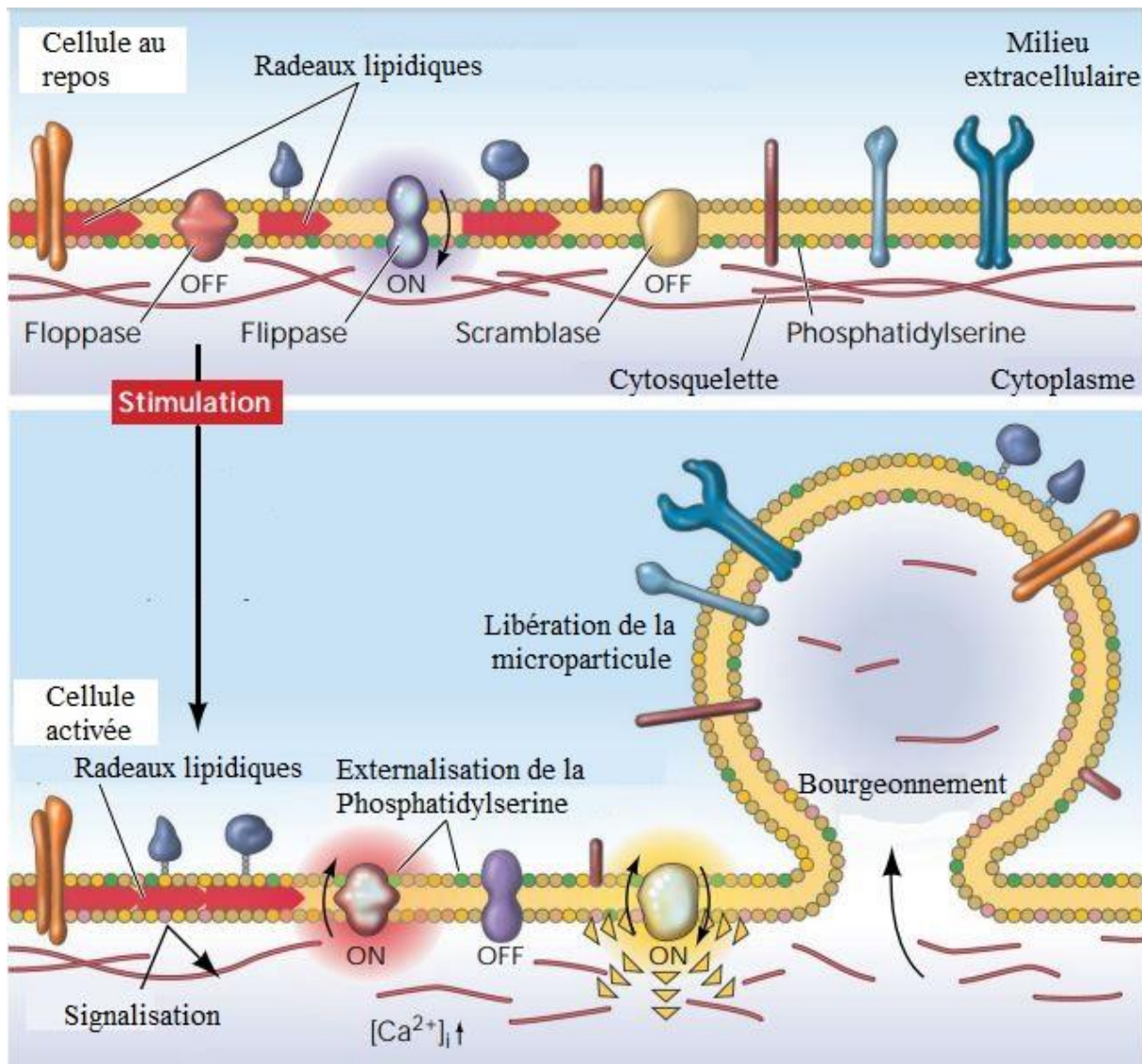


Figure 12 : Réponse de la membrane plasmique à la stimulation cellulaire. La membrane plasmique est une entité bien structurée caractérisée par une distribution transversale contrôlée des lipides et des protéines entre les deux feuillets, mais aussi par une organisation latérale dans les domaines dits « radeaux lipidiques ». Suite à une stimulation, une redistribution générale se produit, conduisant à une restructuration des radeaux lipidiques, une externalisation de la phosphatidylsérine, et une libération de microparticules. La réponse membranaire spécifique est caractérisée par l'inclusion ou l'exclusion contrôlée de certains constituants au niveau des radeaux lipidiques conduisant à la libération de microparticules d'une composition particulière. (Adapté et réimprimé, de [59]). Copyright 2005 International Union of Physiological Sciences/ The American Physiological Society.

1.2.4 Internalisation des vésicules extracellulaires par les cellules cibles

Les VEs atteignant leur cible vont délivrer leur cargo et affecter l'état physiologique ou pathologique de cette cellule receveuse [103]. Ce processus passe par plusieurs étapes.

Les vésicules sont internalisées par endocytose ou par une fusion avec la membrane plasmique. Certains mécanismes moléculaires qui régissent ces étapes sont bien décrits. La composition membranaire des VEs, le type membranaire de la cellule réceptrice ainsi que l'effet apporté par le contenu des VEs orchestrent la machinerie moléculaire mise en place [144].

Le contenu des VEs influence leur devenir [145] : des exosomes enrichis en CD63 sont adressés aussi bien vers les cellules neuronales que gliales, alors que ceux portant la protéine précurseur amyloïde (amyloïde β A4 protéines), sont spécifiquement adressés aux neurones [145]. Les mécanismes d'internalisation de microvésicules sont différents en fonction du type cellulaire receveur. L'internalisation des VEs d'origine oligodendrocytaire se fait par macropinocytose dans les cellules microgliales sans induire de réponse inflammatoire. Alors que l'internalisation de ces VEs n'est pas observée dans les astrocytes [113].

La composition lipidique et protéique de la membrane des cellules réceptrices joue également un rôle dans l'internalisation des VEs. C'est ainsi que Prada et collègues [146] ont montré que des microvésicules issues de cellules microgliales n'ont pas la même dynamique d'interaction avec d'autres cellules microgliales ou avec des astrocytes. Après adhésion sur les cellules microgliales, ces microvésicules sont dirigées vers la région nucléaire. Alors que lors de l'interaction avec les astrocytes, la plupart de ces microvésicules d'origine microgliale restent stablement ancrées à la surface des astrocytes excluant toute internalisation rapide [146].

Enfin, les vésicules peuvent être un apport trophique pour la cellule réceptrice, leur dégradation est alors enclenchée dans le compartiment lysosomal après internalisation et évolution des endosomes précoces en corps multivésiculaires [103,147,148]. Parfois, certaines vésicules peuvent échapper à cette dégradation et de ce fait libérer leur contenu dans le cytoplasme cellulaire post fusion avec les membranes des CMVs ou retourner dans le milieu extracellulaire après fusion des CMVs avec la membrane plasmique [149] (figure 13).

Introduction

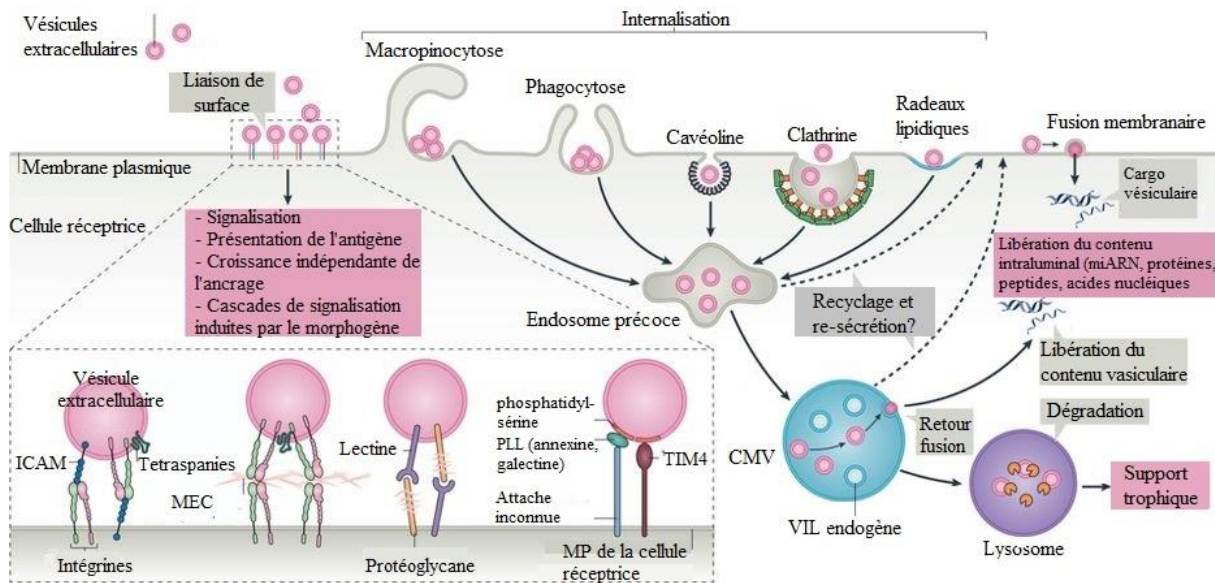


Figure 13 : Devenir des vésicules extracellulaires dans les cellules réceptrices. Dans la cellule réceptrice (qui peut être la cellule productrice elle-même), des vésicules extracellulaires exogènes se lient à la surface de la cellule (voir encadré) et peuvent avoir diverses destinations. Selon le type de cellule, elles peuvent rester liées à la surface (par exemple, aux intégrines) et initier des voies de signalisation intracellulaires (par exemple, la présentation de l'antigène). Les vésicules extracellulaires peuvent également être internalisées par plusieurs voies. L'internalisation ciblera les vésicules extracellulaires exogènes dans la voie endosomale canonique, en atteignant les endosomes multivésiculaires (CMVs), dans lesquels les vésicules internalisées seront probablement mélangées avec des vésicules intraluminales endogènes (VILs). La fusion des CMVs avec le lysosome conduira à la dégradation des vésicules extracellulaires et au recyclage de leur contenu pour alimenter le métabolisme de la cellule réceptrice. Les vésicules extracellulaires amarrées au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane limitante des CMVs peuvent libérer leur contenu intraluminal dans le cytoplasme de la cellule réceptrice par fusion, processus actuellement mal compris mais d'une importance majeure pour la délivrance de cargaisons intraluminales telles que les microARN (miARN). Il est à noter que rien n'indique jusqu'à présent d'exclure le potentiel de recyclage des vésicules endocytées vers la membrane plasmique (flèches en pointillés). MEC= matrice extracellulaire ; ICAM= molécule d'adhésion intercellulaire ; TIM4= *T cell immunoglobulin mucin receptor 4*; MP= membrane plasmique ; PLL = protéines liées aux lipides. (Adapté et réimprimé avec permission, de [103]) . Copyright 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature.

1.2.4.1 Liaison à la membrane

1.2.4.1.1 Interaction protéine-protéine

Les VEs sont amarrées à la membrane plasmique par des interactions de type protéine-protéine [150,151]. Les tétraspanines, abondantes à la surface des VEs peuvent interagir avec la surface des cellules cibles [152]. Des microdomaines riches en tétraspanines sont impliqués dans un certain nombre de processus de fusion entre les vésicules et les cellules [92]. Le traitement des cellules cibles avec des anticorps anti-tétraspanines CD81 ou CD9 [153] réduit l'absorption de VEs par les cellules dendritiques [154]. La tétraspanine Tspan8 est connue pour former des complexes avec les intégrines. Les cellules qui surexpriment Tspan8, secrètent des VEs formant un complexe avec CD49d, une sous unité alpha des intégrines. La présence de ce complexe, qui a pour ligand majeur une molécule d'adhésion ICAM (*intercellular adhesion molecule*) facilitant l'internalisation de ces VEs au niveau des cellules cibles [152], contribue à l'absorption des VEs par les cellules endothéliales chez le rat [155].

Les protéoglycanes sont des protéines riches en composés glucidiques à l'image des héparane-sulfate protéoglycanes (HSPG), protéines contenant du glycosaminoglycane sulfaté [144]. Les principales familles d'HSPG sont les syndécans pour les protéines transmembranaires et les glypicanes pour les protéines à ancrage GPI (*glycosyl-phosphatidyl-inositol*). Un traitement dose dépendant des cellules à l'héparine qui mime l'héparane induit une diminution dans l'internalisation des VEs jusqu'à 55% dans des structures vésiculaire intraluminales positives au syndécane-GFP et glypicanes-GFP [151]. Le traitement des VEs par l'héparinase, une enzyme qui enlève les HSPG de surface, n'a pas d'incidence sur la pénétration des vésicules dans les cellules. Ensemble, ces éléments montrent que les protéoglycanes ont un rôle important dans l'internalisation des VEs par les cellules cibles. Les données suggèrent que les HSPG portés par les vésicules ont une moindre implication dans l'internalisation que ceux portés par les cellules cibles [151].

1.2.4.1.2 Mécanismes d'endocytose

Le terme endocytose regroupe plusieurs mécanismes de voies d'internalisation cellulaire [156]. Des expériences d'inactivation génétique, d'utilisation d'anticorps pour empêcher la liaison ligand/récepteur ou d'inhibiteurs chimiques de certaines voies du trafic intracellulaire ont permis de mettre en évidence les processus endocytiques impliqués dans l'internalisation des VEs, y compris la macropinocytose [113], la phagocytose [157] l'internalisation clathrine

dépendante [158] ou cavéoline dépendante [159] et enfin l'implication des radeaux lipidiques [160].

1.2.4.1.2.1 *La macropinocytose*

La macropinocytose est une voie d'internalisation endocytaire qui implique l'invagination de la membrane plasmique donnant naissance à des déformations membranaires qui se ploient ensuite dans le compartiment intracellulaire formant ainsi une vésicule [161]. C'est un mécanisme semblable à celui de la phagocytose, cependant, le contact direct avec le matériel internalisé n'est pas nécessaire [144]. Ce mécanisme dépend de Rac 1 (une protéine à activité GTPase), de l'actine (une protéine du cytosquelette), du cholestérol (lipide membranaire) et de l'échange d'ion Na^+/H^+ [162]. Cette internalisation des VEs peut être diminuée aussi bien par l'utilisation d'un inhibiteur de Rac 1 (NSC23766), d'un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (cytochalasine D) ou d'un inhibiteur spécifique de l'activité de l'échangeur d'ion Na^+/H^+ (amiloride) [113]. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs n'influe pas sur l'internalisation des vésicules dans tous les types cellulaires [163] suggérant que la macropinocytose est un type d'internalisation de VEs cellulaire dépendant [144].

1.2.4.1.2.2 *La phagocytose*

La phagocytose est une invagination progressive de la membrane pour entourer le matériel destiné à être internalisé, ce processus ne nécessite pas un repliement membranaire comme c'est le cas de la macropinocytose [164]. C'est un mécanisme d'internalisation de structures de taille importante, que les macrophages utilisent cependant pour absorber efficacement des VEs de cellules leucémiques. Ces VEs co-localisent ensuite avec les phagosomes [163]. Les protéines PI_3K jouent un rôle important dans les processus phagocytaires, en particulier en permettant la formation des phagosomes par invagination de la membrane plasmique [165]. L'utilisation d'inhibiteurs de la PI_3K comme la wortmannine ou le LY294002, induit une diminution de l'internalisation de ces VEs par les macrophages [163]. L'inhibition n'a cependant pas de conséquences sur l'internalisation des VEs dans d'autres types cellulaires [144].

La phosphatidylsérine (PS), phospholipide amphiphile est généralement située sur le feuillet interne de la membrane plasmique, cependant, les VEs sont enrichies en PS sur leur membrane externe [166]. La PS est importante pour le processus de phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages [167]. Celle-ci passerait par le récepteur TIM4 (*T-cell immunoglobulin mucin protein 4*) [168]. En effet, un anticorps anti-TIM4 diminue l'internalisation des VEs par les macrophages [163]. Le traitement de cellules dendritiques de moelle osseuse avec un

analogue soluble et compétitif de PS, l'O-phospho-L-serine réduit leur internalisation de VEs considérablement [154]. Par ailleurs, le traitement des VEs isolées de cellules de neuroblastome (Neuro2a) avec une protéine qui se lie à la PS, l'annexine-V, réduit leur internalisation par des macrophages [169] ou des cellules lymphocytaires NK (*Natural killer*) [170].

1.2.4.1.2.3 *Internalisation clathrine dépendante*

L'endocytose médiée par des vésicules recouvertes de clathrine (VRC) appelées également vésicules mantelées, est un processus d'assemblage progressif du manteau de clathrine au niveau de la membrane plasmique [144]. Ces VRC contiennent les récepteurs transmembranaires liés à leurs ligands présents sur la surface des VEs. L'utilisation d'un inhibiteur qui prévient la formation des puits recouverts de clathrine, la chlorpromazine [171], induit une baisse de l'internalisation de VEs par des cellules cancéreuses de l'ovaire [157]. Le récepteur au facteur de croissance épidermique substrat du clone 15 (EPS 15), un composant des puits de clathrine qui se lie à l'adaptateur AP-2, est un composant à part entière du manteau de clathrine [172]. Une diminution de l'expression d'EPS 15 par mutation dominant négatif induit une réduction de l'endocytose clathrine dépendante et de ce fait une diminution de l'internalisation des VEs [163]. De même, une invalidation génique de la sous unité $\mu 2$ de l'adaptateur AP-2, se traduit par une diminution de l'internalisation des exosomes par les cellules PC-12, une lignée cellulaire issue d'un phéochromocytome de la médullosurrénale de reins chez le rat [173]. Les VRC déforment la membrane qui s'enfonce dans la lumière du cytoplasme cellulaire en formant un bourgeon vésiculaire. La dynamine 2, une protéine à activité GTPase, forme un collier au niveau du bourgeon vésiculaire en formation. Elle permet la constriction et la libération de la VRC formée par changement de conformation suite à l'hydrolyse du GTP [174] [175,176]. Après perte du revêtement de clathrine, les vésicules d'endocytose fusionnent avec l'endosome précoce alors que la clathrine est recyclée [158].

1.2.4.1.2.4 *Internalisation clathrine indépendante*

1.2.4.1.2.4.1 *Internalisation cavéoline dépendante*

Les mécanismes d'internalisation de vésicules dépendant de la cavéoline (VDC) sont de plus en plus décrits [177,178]. Les cavéoles sont de petites invaginations dans la membrane plasmique qui, comme les puits de clathrine, peuvent s'internaliser et former un bourgeon en direction de la lumière du cytoplasme. Les cavéoles sont riches en cholestérol, sphingolipides et cavéoline [156]. Une invalidation du gène CAV1 réduisant l'expression de la protéine cavéoline-1, conduit à une baisse dans l'internalisation des VEs [179]. Comme pour l'endocytose des VRC,

des acteurs comme la dynamine 2 semblent également jouer un rôle dans l'internalisation des VEs par la voie des cavéolines. Une inhibition de la dynamine 2 par du dynasore provoque un manque d'internalisation des VEs. Cependant, en vue de son implication dans l'endocytose des VRC, il est difficile de statuer sur la voie d'endocytose la plus touchée [179].

1.2.4.1.2.4.2 *Endocytose faisant intervenir des radeaux lipidiques*

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines au sein de la membrane plasmique avec une composition phospholipidique modifiée qui affecte la fluidité des membranes. Les microdomaines sont enrichis en récepteurs protéiques, en cholestérol et en sphingolipides tels que la sphingomyéline [159]. Cette composition plus ordonnée et plus serrée les rend moins fluides que le reste de la bicouche membranaire et leur procure une aptitude à flotter, assurant ainsi le trafic des protéines membranaires [180]. Ces radeaux lipidiques peuvent être trouvés dans les invaginations formées par la cavéoline-1 ou dans les régions planes de la membrane plasmique marquées par la présence d'une autre famille de protéines appelée flotillines [160]. Les flotillines peuvent être liées aux protéines d'ancrage GlycosylPhosphatidyInositol (GPI) pour être internalisées. Présentes à la surface des VEs, les flotillines pourraient être impliquées dans l'internalisation de vésicules [181]. Des agents qui inhibent la présence de cholestérol des membranes comme le méthyl- β -cyclodextrin (M β CD) [178], la filipine [182] et la simvastatine [178] empêchent l'internalisation des VEs par des cellules receveuses. D'autres protéines comme par exemple l'annexine-II, ou l'annexine-VI pourraient intervenir dans l'ancrage des VEs à la membrane plasmique ou dans le trafic vers l'endosome tardif respectivement [183].

1.2.4.1.3 *Fusion avec la membrane plasmique*

Un autre mécanisme d'entrée possible des VEs dans la cellule cible est la fusion directe de la membrane des VEs avec la membrane plasmique [184]. Les bicouches lipidiques se rapprochent, les feuillettes externes entrent en contact direct, provoquant leur héli-fusion puis un pore de fusion s'ouvre et les extrémités hydrophobes se réarrangent pour donner une structure cohérente, imagée par des points tillés (figure 14) [185].

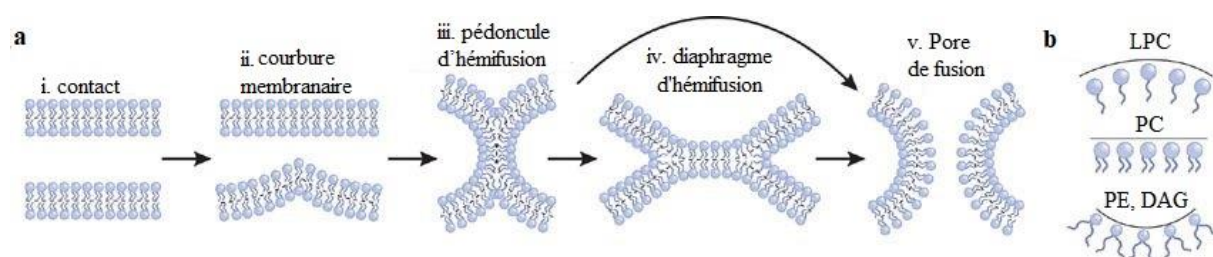


Figure 14 : La voie de fusion par hémifusion de la bicouche lipidique. (a) (i) Contact avant fusion. (ii) Courbure de la membrane en forme de pointe minimise l'énergie de la répulsion entre les deux feuillets rapprochés des membranes entrant en contact. (iii) Formation d'un pédoncule d'hémi-fusion avec les feuillets proximaux fusionnés et les feuillets distaux non fusionnés. (iv) L'expansion du pédoncule produit le diaphragme d'hémifusion. (v) Ouverture d'un pore de fusion dans la bicouche du diaphragme d'hémifusion, ou directement à partir du pédoncule d'hémi-fusion. Les lignes en pointillées indiquent les limites des surfaces hydrophobes des monocouches. (b) Différents lipides forment spontanément des monocouches de courbures différentes. Les monocouches de lysophosphatidylcholine (LPC) forment un renflement dans la direction des têtes polaires et celles de phosphatidyléthanolamine (PE) et de diacylglycérol (DAG) dans la direction des chaînes hydrocarbonées. La phosphatidylcholine cylindrique (PC) forme une monocouche presque plate. (Adapté et réimprimé avec permission, de [185]). Copyright 2008 Nature publishing group.

Plusieurs familles de protéines participent à ce processus, y compris les protéines SNAREs, les protéines RAB et des protéines impliquées dans la transmission synaptique, les protéines SEC1/MUNC-18 (protéines SM) [131]. La famille Sec1 comprend à ce jour, plusieurs membres identifiés chez la levure, [186] chez les nématodes et chez les mammifères [187]. Les protéines Sec1 sont principalement hydrophiles et n'ont pas de domaine transmembranaire. Néanmoins, elles sont soit cytoplasmiques et solubles, soit liées à la membrane [187]. La manière dont les protéines SM coopèrent avec les complexes SNARE pour la fusion n'est pas encore complètement connue. La coopération avec les SNAREs permettrait une conformation favorable à la fusion. Ainsi, la topologie en anneau faciliterait l'ouverture des pores de fusion [188]. Les protéines SM agissent probablement comme catalyseurs pour les SNARE, qui sont à leur tour des catalyseurs pour la fusion membranaire [189]. Dans des études sur la communication synaptique, une abolition de Munc18-1 rend le cerveau synaptiquement silencieux, faisant de Munc18-1 une protéine essentielle intervenant dans la libération des neurotransmetteurs par les vésicules synaptiques lors du développement [190].

L'ensemble des études présentées traduisent des mécanismes de phagocytose divers impliqués dans l'internalisation de différents types de VEs. L'optimisation et le développement de nouvelles technologies plus résolutive, notamment celles liées à l'acquisition d'images en temps réel couplées à des études *in vivo*, facilitera la compréhension des mécanismes d'internalisation des VEs ainsi que de leur devenir intracellulaire.

1.2.5 Cargo des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires sont de plus en plus étudiées car elles sont retrouvées dans des processus autant physiologiques que pathologiques. La connaissance du contenu des VEs, communément appelé “cargo“, est importante pour en comprendre les fonctions. Dans ce cadre, la communauté internationale pour l'étude des vésicules extracellulaire (*ISEV*) s'est penchée sur la question au travers d'un sondage auprès des scientifiques adhérents afin de déterminer, entre autres, pour quelles applications sont étudiées les VEs. Il en ressort qu'elles sont principalement étudiées à 72% pour leurs fonctions *in vitro*, à 64% pour leur contenu en acide ribonucléique et à 47 % pour leur contenu protéique (figure 15).

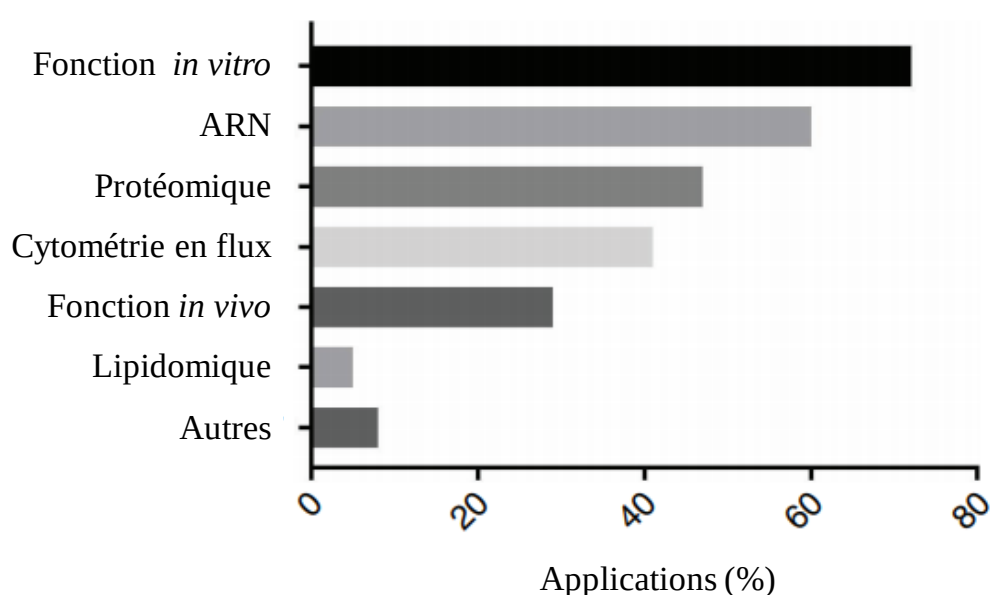


Figure 15 : Pourcentage des applications en aval de l'isolement des VEs. Un sondage auprès de la communauté ISEV a révélé que les applications les plus courantes sont les analyses fonctionnelles *in vitro* (72%), les analyses d'ARN (60%), les analyses protéomiques (47%), les analyses fonctionnelles *in vivo* (29%) et les analyses lipidomiques (5%). (Adapté et réimprimé avec permission, de [191]). Copyright 2016 the author(s).

1.2.5.1 Contenu protéique

Des études protéomiques de vésicules extracellulaires libérées par des cultures primaires de cellules, de lignées cellulaires, de cultures organotypiques ou de fluides biologiques ont donné des catalogues détaillés des protéines présentes dans différents types de VEs. Ces listes d'identification ont été regroupées dans des bases de données en ligne comme Vesiclepedia (www.microvesicles.org/) [192], EVpedia (www.evpedia.info) [193] et ExoCarta (www.exocarta.org) [194].

Introduction

En général, les VEs sont très riches en protéines membranaires, associées au cytosquelette, cytosoliques, de choc thermique, ainsi qu'en protéines impliquées dans le trafic vésiculaire comme décrit précédemment dans ce manuscrit. Les protéines des organites intracellulaires comme celles du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, du compartiment mitochondrial ou du noyau sont moins abondantes. A titre d'exemple, les annexines, les protéines du cytosquelette (actines, cofiline-1, ezrine/radixine/moesine, profiline-1 et tubulines), les protéines de choc thermique (Hsp70 et Hsp90), les intégrines, les enzymes métaboliques (énolases, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, peroxiredoxines et pyruvate kinase), les protéines ribosomales, les tétraspanines (CD9, CD63 et CD81) et les protéines liées au trafic cellulaire (TSG101, Alix, ESCRT, RAB, syntenin-1) sont les protéines vésiculaires les plus fréquemment identifiées [195] (figure 16). Il est à noter que selon le type cellulaire et la méthodologie employée pour l'isolement des VEs, le contenu caractérisé peut différer. Il est donc important de connaître les protocoles employés et même d'en combiner plusieurs pour la caractérisation du contenu vésiculaire. L'harmonisation des protocoles permet enfin d'effectuer des comparaisons des différents contenus vésiculaires [61,62].

Des études menées sur le cargo protéique on retiendra que les profils protéomiques obtenus sont fortement dépendants de la manière dont les VE sont isolées. Par conséquent, ces protéomes vésiculaires fournissent des informations diverses sur la nature des vésicules extracellulaires et aident à décoder les mécanismes moléculaires impliqués dans le tri et la biogenèse des cargaisons vésiculaires, ainsi que les diverses fonctions physiologiques et pathologiques de ces organites extracellulaires complexes. Enfin, la spectrométrie de masse à haut débit facilite la découverte de biomarqueurs de VEs sur la base de signatures protéiques des cellules émettrices. A noter qu'une cellule donnée peut contenir différents types de corps multivesiculaires caractérisés par un contenu différentiel des exosomes [196]. La caractérisation protéique des VEs est généralement associée à des expériences basées sur des identifications de protéines « marqueurs » par western-blots de VEs (bien que pas nécessairement spécifique) ou encore par l'immuno marquage en microscopie électronique (immuno gold). Le développement technologique des cytomètres en flux a permis d'envisager l'analyse des VEs malgré leur taille réduite, une avancée considérable dans l'étude des sous-types vésiculaires [197].

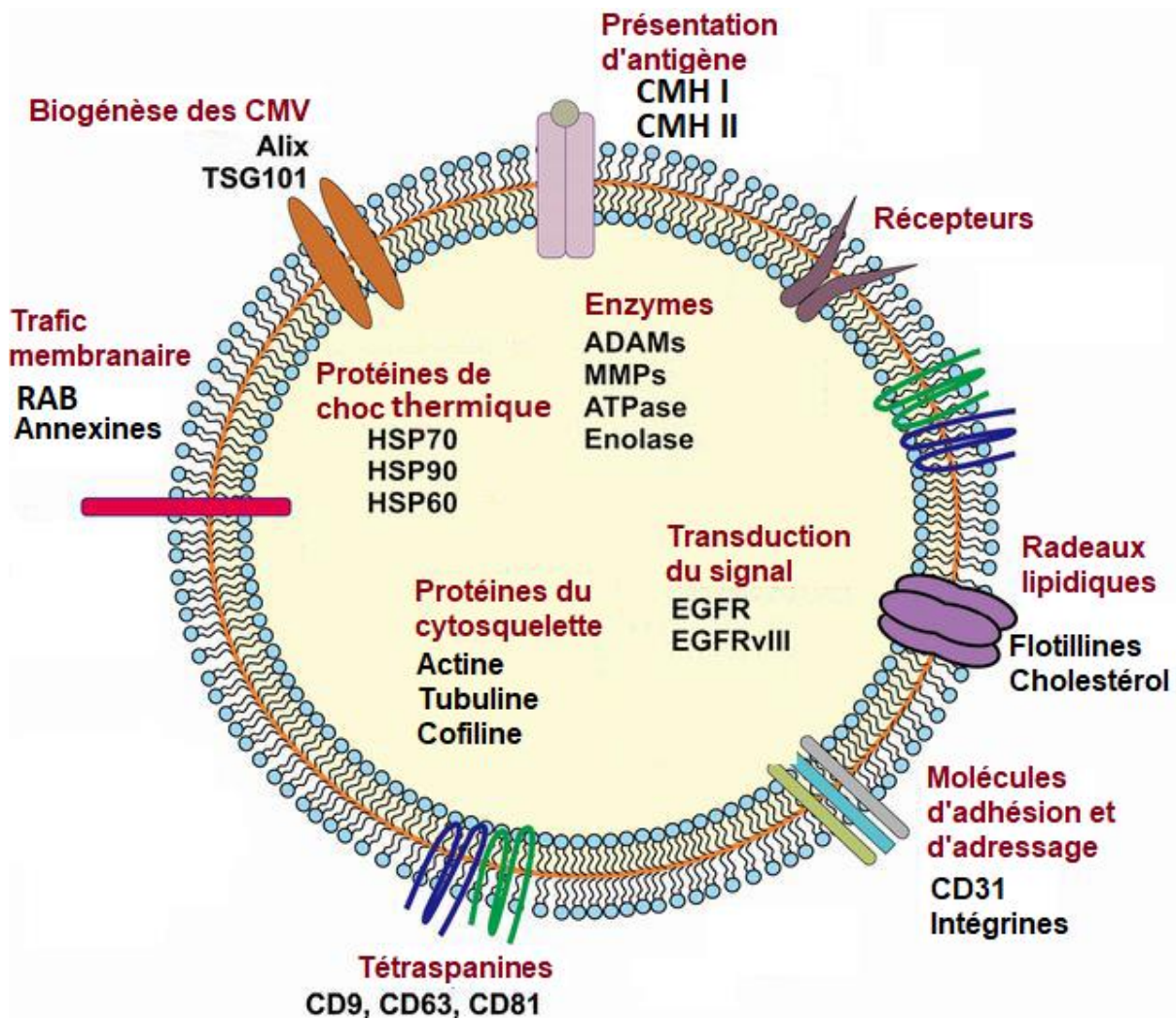


Figure 16 : Cargo protéique des vésicules extracellulaires. Représentation non exhaustive des protéines communément retrouvées dans les vésicules extracellulaires et de leur implication biologique. Alix = *ALG-2 interacting protein X* ; TSG101= *Tumor susceptibility gene 101* ; CMH= *Complexe Majeur d'Histocompatibilité* ; ADAMs= *A disintegrin and metalloproteinase* ; MMPs= *matrix metalloproteinases* ; ATP= *adenosine triphosphate* ; HSP= *heat shock protein* ; EGFR= *epidermal growth factor receptor*. Adapté et réimprimé de [198]. Copyright 2009 - 2018 AME Publishing Company.

1.2.5.2 Contenu lipidique

Actuellement les analyses lipidomiques permettent des avancées importantes dans l'étude des fonctions physiologiques des vésicules extracellulaires. Elles sont généralement réalisées sur des VEs provenant de lignées cellulaires et de fluides biologiques d'espèces multiples. Ces études ont notamment mis en évidence le rôle de plusieurs lipides dans la biogénèse et la fonction des VE [199]. Des lipides ont été inclus dans les bases de données comme Vesiclepedia [192] et EVpedia [193]. Même si des différences dans la composition en lipides des VEs issues de sources différentes soient déjà constatées [200], une synthèse de quelques études menées sur les lipides et les observations auxquelles elles ont abouties sont résumées dans le tableau 1. En général, les VEs sont enrichies en sphingomyéline, cholestérol, phosphatidylsérine et glycosphingolipides comparées à leur cellule d'origine [201]. La composition en lipides caractéristiques de la bicouche des VEs contribue probablement à la stabilité dont elles font preuve dans les différents environnements intracellulaires et extracellulaires [200]. Cette composition particulière suscite l'intérêt et ouvre des perspectives pour l'administration de médicaments sous forme de liposomes [202].

Les membranes des VEs contiennent des radeaux lipidiques riches en cholestérol et en sphingomyéline ce qui leur confère une résistance aux détergents [203]. Le cholestérol permet la régulation de la libération de VEs [204]. Ce phénomène a été mis en évidence pour la libération dépendante du cholestérol de plusieurs virus à enveloppe, dont le VIH-1, qui utilise les radeaux lipidiques et les domaines riches en tétraspanines pour sortir des cellules hôtes [200]. Le céramide, formé par l'action de la sphingomyélinase 2 neutre sur la sphingomyéline, a également été proposé comme impliqué dans la formation de vésicules intraluminales dans les corps multivésiculaires [86].

En plus du rôle structurel essentiel dans la formation des membranes des VE, les lipides tels que les eicosanoïdes, les acides gras et le cholestérol sont des molécules bioactives et peuvent être transférées entre cellules par l'intermédiaire des VEs [201].

Même si seule une minorité de lipides sont décrits à ce jour, des études lipidomiques supplémentaires sur les EVs provenant de différents types de cellules et de fluides biologiques sont nécessaires pour élucider le rôle de ces constituants structurels et fonctionnels essentiels dans la biogénèse et les fonctions biologiques des VEs.

Tableau 1 : Etude du cargo lipidomique dans les vésicules extracellulaires

Type cellulaire ou fluide biologique/ espèce	Analyse lipidique	Observations
Reticulocyte/ <i>Ovis aries</i>	CCM	Phospholipides sensiblement les mêmes que dans la membrane plasmique
Reticulocyte/ <i>Cavia porus</i>	CCM	Composition lipidique similaire à celle des membranes érythrocytaires, bien que la teneur en phosphatidyléthanolamine soit significativement inférieure
Lymphocyte B (RN HLA-DR15+) / <i>Homo sapiens</i>	CCM	Les VEs dérivés de LB sont, enrichis en cholestérol, sphingomyéline et ganglioside GM3
Cellules dendritiques et mastocytes/ <i>Homo sapiens</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , respectivement	CL-DF; CG-DIF	Composition lipidique spécifique et organisation membranaire inhabituelle
Mastocytes (RBL-2H3)/ <i>Rattus norvegicus</i>	CL-DF	Phospholipase D2, enrichie dans les VEs et dont l'activité est corrélée à la quantité de VEs
Mastocytes (RBL-2H3)/ <i>Rattus norvegicus</i>	FD	Deux sous-populations de VEs : l'une enrichie en lipides du Golgi et l'autre enrichie en lipides de granules
Précurseur oligodendroglial (Oli-neu)/ <i>Mus musculus</i>	LC-MS	VEs enrichis en céramides, ce qui déclenche le bourgeonnement et la libération réduite par inhibition de la sphingomyélinase 2 neutre
Mélanomes (Mel1)/ <i>Homo sapiens</i>	CCM	Comparaison entre les VEs et les cellules dans différentes conditions de pH montrant que les VEs acides sont enrichis en SM et en ganglioside GM3, ce qui peut affecter positivement leur capacité de fusion
Mastocytes (RBL-2H3)/ <i>Rattus norvegicus</i>	CG-DIF; GC-MS	Phospholipases et prostaglandines pouvant être activées
Reticulocytes/ <i>Rattus norvegicus</i>	CCM	Les modifications de la composition lipidique au cours de leur différenciation parallèlement à leurs propriétés physiques
Pancréatique cancéreuse (SOJ-6)/ <i>Homo sapiens</i>	GC	L'enrichissement en cholestérol et en MS et l'épuisement des phospholipides peuvent entraîner la mort.
Monocytes dérivés de	LC-MS	Une caractérisation lipidomique montre que les VEs facilitent l'infection par le VIH-1

Introduction

macrophage/ <i>Homo sapiens</i>		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	LC-MS; GC-MS	Identification de 33 espèces de phospholipides, outre les acides gras et les glycosphingolipides neutres, dans les VEs de la phase pathogène de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Cancer de la prostate/ <i>Homo sapiens</i>	LC-MS	Comparaison de la teneur en lipides des vésicules extracellulaires et de leurs lignées prostatiques
Cancer de la prostate (PC-3)/ <i>Homo sapiens</i>	LC-MS	lipidomiques des vésicules extracellulaire de PC-3s. Les VEs sont très enrichies en glycosphingolipides, sphingomyéline, cholestérol et phosphatidylsérine
Sperme/ <i>Homo sapiens</i>	CCM; CG-DIF	Des rapports cholestérol / phospholipides très élevés sont détectés dans des prostasomes isolés à partir de sperme humain. Le rapport molaire cholestérol / sphingomyéline / glycérophospholipides est de 4: 1: 1
Sperme/ <i>Homo sapiens</i>	CCM; CG-DIF	Le profil des acides gras dans les lipides du prostasome est différent de celui des lipides dans la membrane du sperme. La fusion entre les prostasomes et le sperme peut stabiliser la membrane plasmique du sperme en l'enrichissant en cholestérol, en sphingomyéline et en glycérophospholipides saturés.
Sperme/ <i>Equus ferus caballus</i>	CCM; CG-DIF	Comparaison des compositions lipidiques des prostasomes équins et humains et de la manière dont les lipides peuvent être liés aux différentes physiologies de la reproduction des espèces
Sperme/ <i>Sus scrofa</i>	CCM	Les prostasomes de sanglier contiennent de grandes quantités de cholestérol et de phospholipides
Sperme/ <i>Homo sapiens</i>		Caractérisation du contenu lipidique de 2 populations de prostasomes. Les deux types avaient une composition lipidique inhabituelle, avec des niveaux élevés de sphingomyéline, de cholestérol et de glycosphingolipides
Plasma/ <i>Homo sapiens</i>	CCM	Les microparticules plasmatiques contiennent un taux de phosphatidylcholine (59%), de sphingomyéline (21%) et de phosphatidyléthanolamine (9%).
Urine/ <i>Homo sapiens</i>	LC-MS	Les VEs provenant d'échantillons d'urine de patients atteints d'un carcinome rénal et de donneurs sains présentent une composition lipidique différente. Première preuve d'une relation entre la composition lipidique des VE urinaires et cette maladie

CCM: Chromatographie en couche mince. CL-DF: Chromatographie liquide – Détection par fluorescence. LC-MS: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. CG-DIF: chromatographie en phase gazeuse - Détecteur à ionisation de flamme. GC-MS: chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse. Adapté à partir de [200].

1.2.5.3 Contenu en acides nucléiques

1.2.5.3.1 Acides ribonucléiques (ARN)

L'ARN extracellulaire existe sous différentes formes : il peut être enfermé dans des VEs, lié à des complexes protéiques, ou exister sous forme libre. Afin de vérifier la localisation intraluminale de l'ARN dans les VEs, un traitement des échantillons vésiculaires par RNaseA est nécessaire pour neutraliser les formes libres [205]. Certaines études ont rapporté que l'interaction des ARN avec la protéine Argonaute 2 (Ago2) peut permettre de résister à la RNaseA [206]. Il est de ce fait recommandé de prétraiter les VEs avec la protéinase K qui rend les complexes AGO-ARN sensibles à la dégradation par les ARNase [207].

La présence d'ARN fonctionnels dans les VEs a été décrite pour la première fois en 2006 dans les vésicules dérivées de cellules souches murines [208] et en 2007 dans des VEs issues de mastocytes murins internalisés par les mastocytes humains où ils étaient traduits en protéines murines. Ces éléments sont intéressants, sachant que les VEs ne transportaient pas de mécanismes fonctionnels pour la synthèse protéique [37]. Certaines études font état d'une proportion importante d'ARN ribosomiques (ARNr) dans les VEs [71]. Cependant dans la plupart des études sur les VEs ces ARNr sont absents ou alors seules de très faibles quantités d'ARNr 18S ou 28S ont été rapportées [37,209].

Les micro-ARN (ou miARN) sont de courts ARN simple-brin qui possèdent en moyenne 21 nucléotides. Ils sont d'abord transcrits dans le noyau sous la forme de longues séquences primaires dite « pri-miARN » dont la taille varie de quelques centaines de nucléotides à plusieurs kilobases [210]. Ils sont ensuite clivés par un complexe « microprocesseur » formé par les enzymes Drosha (*Ribonuclease III double-stranded (ds) RNA-specific endoribonuclease*) et DGCR8 (*Microprocessor complex subunit DGCR8*) pour générer un ARN précurseur « pré-miARN » d'environ 70 nucléotides [211]. Après leur transfert dans le cytosol, les pré-miARN sont clivés par des enzymes de la famille Dicer pour hydrolyser la structure en épingle à cheveux. Puis les miARN s'associent à la protéine Ago 2. Cette liaison permet ensuite aux miARN d'être pris en charge par le complexe miRISC (*miRNA- Induced Silencing Complex*) afin de cibler des ARNm et d'en réguler l'expression (figure 17) [200]. L'analyse biochimique des complexes contenant des TRBP (*Transactivating response RNA-Binding Protein*) a révélé l'association du Dicer-TRBP avec Ago2, le moteur catalytique du RISC [212]. Les miARN sont détectés à la fois dans les vésicules mais également sous forme soluble liés à Ago2 ou à des HDL (*High-Density Lipoproteins*) [213].

Introduction

L'accumulation de résultats indique que l'incorporation des miARNs dans les VE permet à ces miARNs de circuler dans le sang tout en évitant la dégradation due à l'activité des ARNases présentes dans le sang. L'élimination sélective de certains miARNs dans les VEs a également été suggérée comme un moyen rapide de réguler l'expression génique comme par exemple pendant l'activation des lymphocytes lors de la vaccination [214] ou comme un mécanisme impliqué dans l'apparition des métastases par élimination des miARN suppresseurs tumoraux dans les vésicules [215]. Une liste des miRNA incorporés dans les VEs est disponible dans les bases de données miRandola [216], EVpedia [193] et Vesiclepedia [192].

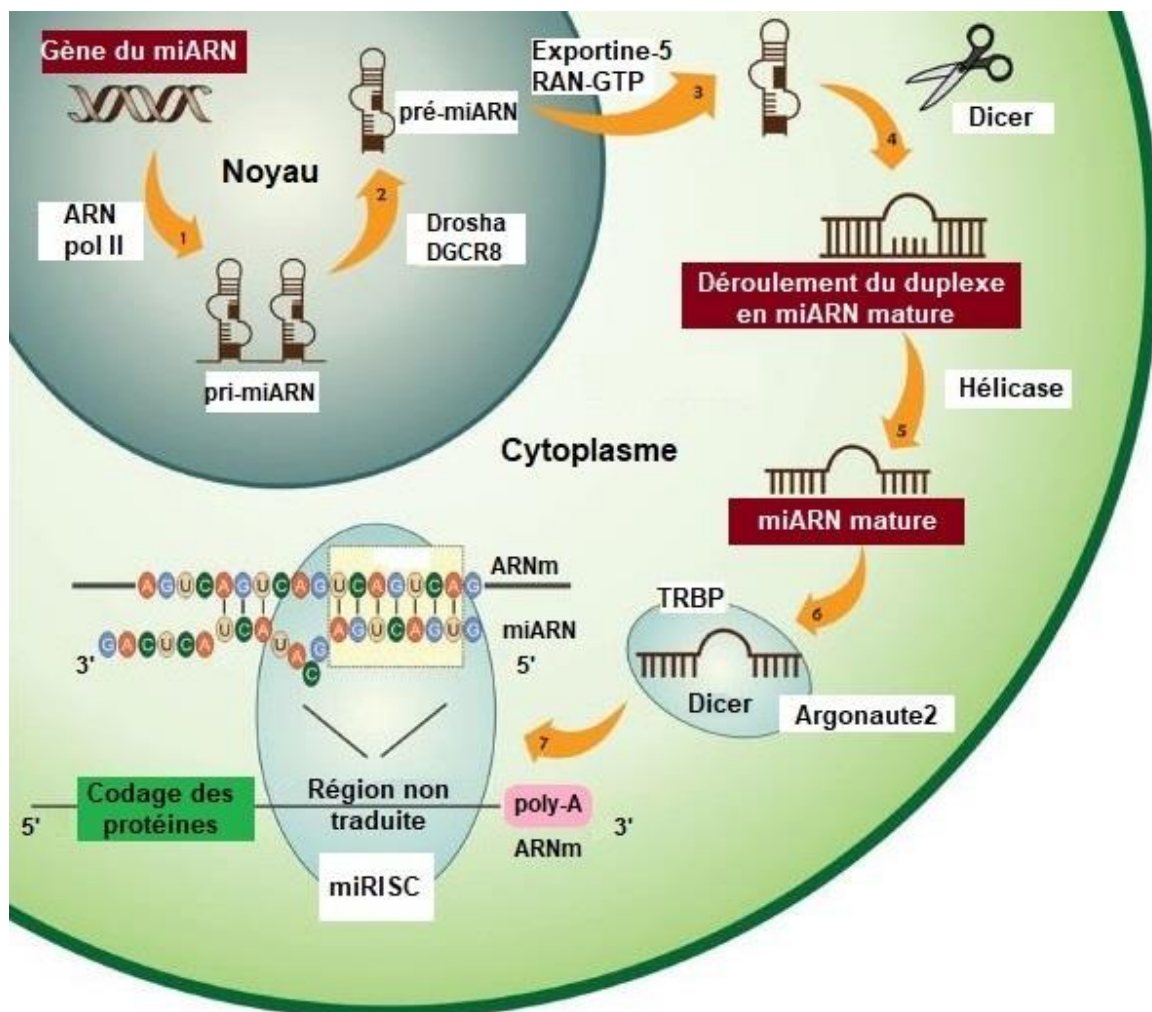


Figure 17 : Voie de biogenèse des miARN. Les miARNs sont transcrits par l'ARN Pol II pour produire des pri-miARN (structures en épingle à cheveux), qui sont clivés par le complexe Drosha-DGCR8 pour générer un pré-miARN qui est transporté vers le cytoplasme *via* l'exportine-5 et Ran-GTP pour être ensuite traités par Dicer et donner un miARN mature. Le miARN est chargé dans le complexe RISC, qui contient les protéines Ago-2 et TRBP. La liaison du miARN à l'ARNm se produit dans une région de 5 à 8 nt de la séquence 3'UTR. (Réadapté de [211]). Copyright 2015 by De Gruyter.

1.2.5.3.2 Acide désoxyribonucléique (ADN)

La présence d'ADN dans les vésicules extracellulaires a été décrite pour la première fois dans les corps apoptotiques [217]. Les corps apoptotiques sont produits au cours du processus de mort cellulaire programmée, ou apoptose [218]. La présence d'ADN mitochondrial (ADNmt) [219] et d'ADN chromosomique a été observée dans les VEs [220]. La migration de l'ADNmt peut se faire par l'intermédiaire des VEs et par conséquent, ces VEs peuvent représenter une voie alternative par laquelle l'ADNmt modifié pénètre dans les cellules, favorisant la diffusion de pathologies [221]. De l'ADN marqué, emballé dans des VEs de cardiomyocytes peut être capté par des fibroblastes [222] par des mécanismes d'endocytose ou de fusion. La détection du marquage peut alors être observée aussi bien dans le cytosol que dans le noyau des fibroblastes [220]. Les VEs tumorales contiennent de l'ADN qui reflète l'état génétique de la tumeur, y compris l'oncogène c-Myc [131]. Le fait que l'ADN transporté par les VEs puisse être utilisé pour identifier des mutations présentes dans les cellules tumorales parentales illustre le potentiel significatif des VEs en tant que biomarqueurs translationnels, néanmoins l'importance physiologique de l'emballage d'ADN dans les VEs est actuellement inconnue [200].

1.2.6 Techniques d'études des vésicules extracellulaires : applications sur le cargo protéique

1.2.6.1 Enrichissement en vésicules extracellulaires

1.2.6.1.1 Méthodes conventionnelles

1.2.6.1.1.1 L'ultracentrifugation

Cette méthode est la plus simple d'utilisation et représente l'approche conventionnelle couramment utilisée pour l'isolement des VEs [191]. Les particules sont séparées par des forces centrifuges différentielles : les cellules et les corps apoptotiques sont récupérées avec une faible force centrifuge (300g-1200g) tandis qu'une force élevée (100000g) est utilisée pour sédimenter et concentrer les VEs [67]. Bien qu'il s'agisse de la méthode de choix et la plus largement utilisée, elle représente des inconvénients tels que l'encombrement des VEs entre elles, une spécificité du culot diminuée par la présence de protéines agrégées et de protéines ribonucléaires, un temps de traitement long et une instrumentation coûteuse. De plus, une grande quantité d'échantillon est nécessaire pour avoir un rendement suffisant en VEs. L'ensemble de ces éléments encourage à coupler cette technique à d'autres méthodes pour compenser ces limites.

1.2.6.1.1.2 Ultracentrifugation en gradient de densité

Les exosomes ont des densités allant de 1,15 à 1,19 g/mL [64]. Dans l'ultracentrifugation, un échantillon contenant un mélange de vésicules de différentes tailles et de macromolécules considérées comme des contaminants, est déposé soit à la surface (top) soit au fond (down) d'une solution dont la densité augmente du sommet vers le fond du tube [223]. Pendant la centrifugation, les différentes molécules sédimentent à travers le gradient et se regroupent à leurs densités respectives. L'ultracentrifugation en gradient de densité est considérée comme donnant des vésicules plus pures, cependant cette technique ne s'affranchit pas des autres contraintes liées notamment à l'ultracentrifugation. Dans ce genre d'expérience, des solutions de saccharose de concentrations différentes sont couramment utilisées pour fabriquer le gradient. Cependant, ils ne respectent pas la pression osmotique des vésicules. Des gradients d'iodixanol isosmotiques sont plus adaptés pour maintenir les propriétés biophysiques des vésicules en cas d'utilisation pour des applications fonctionnelles [64].

1.2.6.1.1.3 *Co-précipitation*

Des kits commerciaux, dont le principe repose sur des stratégies de coprécipitation de polymères, ont été élaborées pour l'enrichissement en VEs et mis sur le marché, comme par exemple l'ExoQuick® ou encore l'Exo-Spin™. Ces réactifs réduisent généralement l'hydratation des VEs (et donc leur solubilité) pour provoquer leur précipitation. Ce précipité peut être isolé facilement et de manière reproductible avec de faibles forces centrifuges, évitant le recours à une longue ultracentrifugation [224]. Toutefois ces kits ont un coût assez conséquent et ne sont pas rentables pour envisager une utilisation à grande échelle. Les réactifs ne permettent pas une purification suffisamment spécifique des VEs avec des rendements obtenus relativement faibles par rapport aux techniques de centrifugation [223]. De plus, cette approche entraîne également la co-précipitation de lipoprotéines et de complexes d'ARN-Ago2, réduisant la pureté des VEs isolées. L'utilisation de la co-précipitation dans l'isolement des VEs est donc limitée si elle n'est pas couplée à des techniques plus résolutive.

1.2.6.1.1.4 *Chromatographie d'exclusion stérique*

Le principe de la chromatographie d'exclusion, encore appelée gel-filtration, est la séparation des vésicules et d'autres molécules en fonction de leur taille [225]. Le gel se compose de billes sphériques poreuses dont les pores ont une taille calibrée spécifique. Les molécules plus grosses, exclues de ces pores, sortent de la colonne plus tôt que les petites molécules dont le cheminement au travers les pores est plus long. Cela permet de séparer les composants d'un mélange complexe et de corrélérer le temps de rétention des molécules dans la phase à leur taille. Cette méthode de séparation est appliquée à l'isolement des vésicules pour produire des VEs purifiés à partir de milieux biologiques complexes [226]. Des colonnes commerciales (Sépharose, GE Healthcare ; qEV iZon) ont été développées et sont en cours d'optimisation pour simplifier l'isolement des VE en une seule étape [225]. Lorsqu'un échantillon hétérogène, composé de vésicules et d'autres molécules comme des agrégats protéiques est déposé sur ce type de colonne, les petites molécules contaminantes diffusent dans les pores et sont éluées tardivement, tandis que les vésicules sont éluées dans les toutes premières fractions. Les VEs purifiées peuvent toutefois contenir des lipoprotéines contaminantes [227]. La phase utilisée, la taille des pores, l'interaction entre les VEs et les autres composants du mélange, la dimension des colonnes, la quantité de phase dans la colonne, ainsi que le débit de la phase mobile doivent être pris en compte pour améliorer l'efficacité de cette méthode d'isolement afin de la rendre plus résolutive.

1.2.6.1.2 Nouvelles méthodes

1.2.6.1.2.1 Filtration microfluidique

L'isolement en fonction de la taille représente une approche attrayante pour séparer les VE des gros débris cellulaires. Divers systèmes de filtres microfluidiques ont été mis au point pour isoler les VE des gros débris cellulaires et des agrégats formés par les protéines. Par exemple, Rho et collègues ont mis en place un dispositif microfluidique qui utilise des filtres à membrane pour isoler les VEs de façon sélective à partir d'échantillons de sang non traités [228]. Le seuil de taille pour le filtre à membrane utilisé est d'environ 1 μm . Une couche capillaire, insérée sous la membrane, sert à guider les VEs filtrées vers un canal de collecte. La membrane, ainsi que le guide capillaire, sont pris en sandwich entre deux aimants annulaires (figure 18), ce qui permet de remplacer facilement le jeu de filtres lorsque de grands volumes d'échantillons sont analysés. Ce système peut filtrer 300 μl de sang en moins de 10 minutes. L'analyse des VEs purifiés révèle une population homogène de vésicules de taille moyenne évaluée à 167 nm.

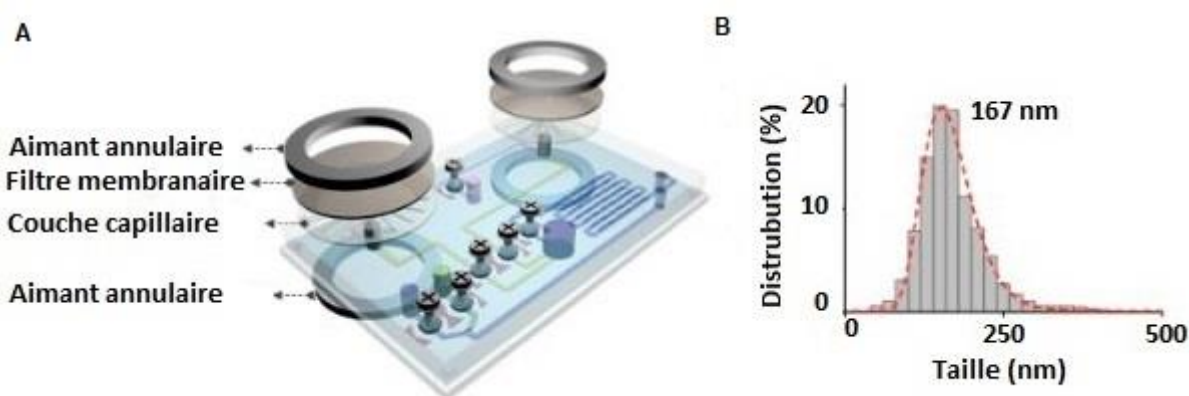


Figure 18 : Méthodes de filtrage microfluidique pour l'isolement et le tri des vésicules extracellulaires. (A) Un dispositif microfluidique qui utilise des filtres à membrane pour isoler les VEs des échantillons de sang non traités. Le dispositif est constitué d'un filtre membranaire de porosité sélective ($<1 \mu\text{m}$) et d'une couche capillaire servant de guide. Le tout assemblé en sandwich entre deux aimants annulaires. (B) L'échantillon de sang filtré a révélé une seule population de VEs avec une taille moyenne de 167 nm. (Adapté et réimprimé avec permission de [228]). Copyright 2013 American Chemical Society.

Récemment, Wunsch et collaborateurs ont fait la démonstration d'enrichissement et de séparation de VEs à l'échelle nanométrique par déplacement latéral déterministe (Nano-DLD) (figure 19) [229]. En effet, les particules dont le diamètre est supérieur ou égal au diamètre critique se déplacent latéralement à travers le réseau par cognement et sont déviées vers le côté droit, tandis que les particules de diamètre inférieur au diamètre critique suivent le flux laminaire en faisant des zigzags. Les auteurs ont utilisé des supports au silicium pour avoir un réseau de matrice dont les piliers sont séparés de 25 à 235 nm [229]. Le dispositif nécessite cependant une pression élevée en raison de la structure dense du réseau et de la durée d'expérimentation limitée. En effet le dispositif peut fonctionner pendant plus de 2 h avant que l'accumulation de particules à l'interface du pilier d'entrée ne l'obstrue et ne permette plus l'acquisition de données significatives.

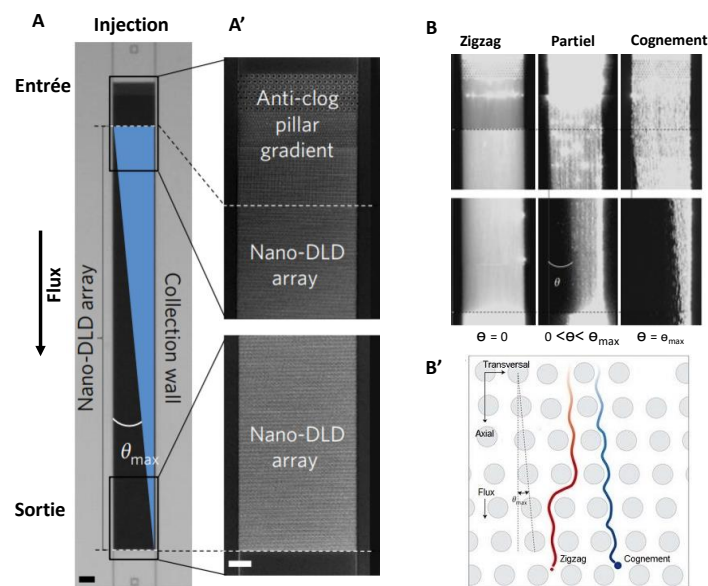


Figure 19 : Séparation de VEs à l'échelle nanométrique par déplacement latéral déterministe Nano-DLD. **A** Image de microscope optique (colonne de gauche) d'un dispositif nano-DLD, qui montre la configuration générale de la matrice. Le triangle bleu indique la zone qui devrait émettre une fluorescence si toutes les particules fluorescentes traversent la matrice en mode cognement. La barre d'échelle indique 20 µm. **A'** La deuxième colonne contient des images de microscopie électronique à balayage des régions d'entrée et de sortie qui bordent le réseau Nano-DLD. La barre d'échelle indique 10 µm. **B** Les trois images de microscopie à fluorescence correspondent à des billes de polystyrène qui s'écoulent dans la région d'entrée (rangée supérieure) et sortent de la région de sortie de la matrice (rangée inférieure). Les modes de déplacement latéral pour zigzag, partiel et cognement sont indiqués pour DP = 20 nm, DP = 50 nm et DP = 110 nm, respectivement. L'angle de migration, θ , indique le déplacement latéral du flux de particules dans la matrice. **B'** Représentation schématique du dispositif qui se présente sous forme d'une matrice formée d'un réseau de piliers écartés de 25 à 235 nm et un angle de migration maximum $\theta_{\max} = 5,7^\circ$. Les trajectoires pour les particules dont le diamètre particule (DP) est inférieur au diamètre critique nominal (DC) suivent un écoulement laminaire en mode zigzag (rouge), tandis que les plus grandes avec $DP \geq DC$ suivent une déviation $\theta_{\max}$ en mode cognement (bleu). (Adapté et réimprimé avec permission de [229]). Copyright 2016 Nature Publishing Group

1.2.6.1.2.2 Capture en immuno-affinité

En raison de sa simplicité, la capture par immunoaffinité est une autre approche très utilisée [230]. Dans cette méthode, les VEs sont capturés avec des anticorps dirigés contre les protéines de surface spécifiques, notamment les tétraspanines CD9, CD63 et CD81 [64]. Divers appareillages microfluidiques complètent cette technique d'isolement sélective des VEs. Zhao et collègues ont récemment mis au point une puce microfluidique l'ExoSearch qui permet l'isolement en continu des VEs en utilisant des billes immunomagnétiques. La puce se compose d'un injecteur en forme de Y et d'un mélangeur fluide en serpentin pour permettre l'incubation et l'immuno-liaison des VEs sur des billes immunomagnétiques [231]. L'approche peut être facilement appliquée dans les établissements de santé à des fins diagnostiques car c'est une approche rapide. Toutefois, ces méthodes sont avant tout basées sur une immunodétection efficace liée à la sensibilité des anticorps. Le résultat est donc souvent sous estimé par rapport à la réalité. De plus, l'efficacité de la technique repose sur la capacité de l'anticorps à reconnaître spécifiquement l'antigène cible. La forte affinité anticorps-antigène de la liaison, difficile à rompre, peut-être également un facteur limitant ne permettant pas la libération de VEs pures pour des utilisations ultérieures.

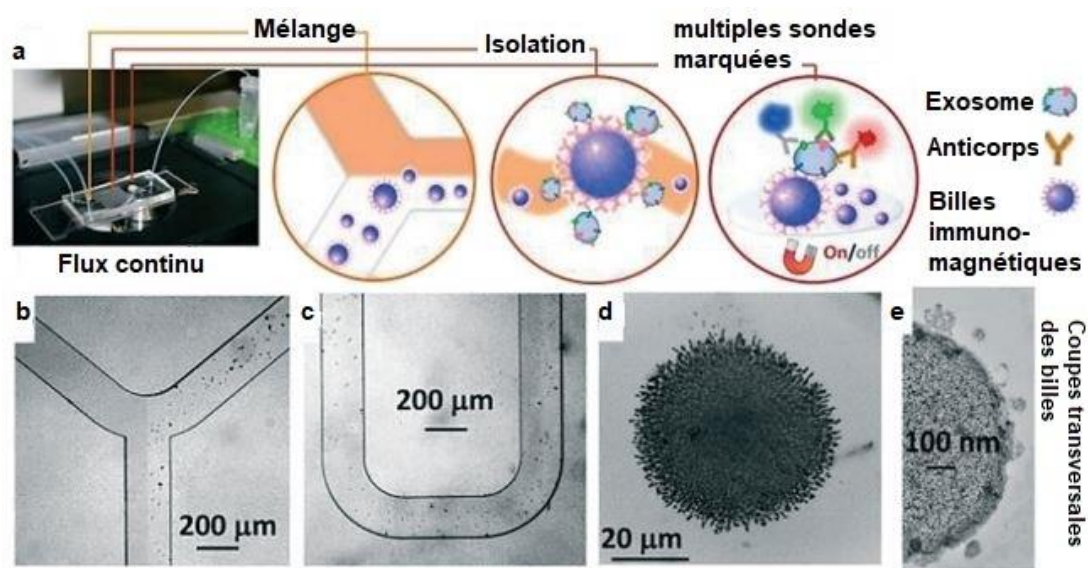


Figure 20 : Enrichissement par immunoaffinité. (a) Schémas d'une puce microfluidique permettant le mélange et l'isolement en continu de vésicules extracellulaires au moyen de billes immunomagnétiques. Les VEs sont enrichies par sélection immunomagnétique et retenues par la force magnétique. Images de microscopie du dispositif: (b) injecteur en forme de Y, (c) mélangeur fluide en serpentin pour liaison immunomagnétique, (d) agrégats magnétiques et (e) VEs liées sur des billes immunomagnétiques. (Adapté et réimprimé avec permission de [231]). Copyright 2016 The Royal Society of Chemistry.

1.2.6.1.2.3 *Tri par ondes acoustiques sans contact*

Lee et collaborateurs ont utilisé des ondes acoustiques pour fractionner les VEs. La séparation utilise les ultrasons stationnaires pour exercer une force acoustique différentielle sur les vésicules en fonction de leur taille et de leur densité [232]. L'appareil se compose d'une paire de transducteurs interdigitaux pour générer une onde acoustique de surface stationnaire. Les particules dans la région acoustique subissent une pression radiaire et migrent. Les plus grandes vésicules se déplacent plus rapidement car la force acoustique est proportionnelle au volume de la vésicule. En optimisant la conception des transducteurs à ultrasons et de l'électronique, les auteurs sont en mesure d'obtenir un rendement de séparation élevé pour isoler des vésicules de taille nanométriques dans un mélange de plusieurs types vésiculaires. Cette méthode semble donc prometteuse pour l'isolement des VEs [232].

1.2.6.1.3 Conclusion pour la partie technique

Aucune des méthodes d'isolement de VEs précédemment discutées ne peut cumuler efficacité, spécificité et rendement. Le choix de la méthode dépend principalement des expériences qui suivent l'isolement des vésicules ainsi que la disponibilité de l'appareillage nécessaire.

L'ultracentrifugation est facile d'utilisation et généralement plus accessible, cependant le culot vésiculaire est contaminé par des protéines agrégées, des lipoprotéines et le complexe miARN-Ago2. L'ultracentrifugation en gradient de densité tend à éliminer ces contaminants avec une perte de rendement d'un facteur 10 environ. La chromatographie d'exclusion est relativement rapide quand la colonne est commerciale, cependant les phases disponibles ne sont pas encore assez résolutive pour se débarrasser des lipoprotéines qui ont un temps de rétention proche de celui des VEs. La reproductibilité des temps de rétention dépend de plusieurs facteurs, rendant compliquée la détection des VEs éluées dans les mêmes fractions que les contaminants au fil des répliquats. La co-precipitation par utilisation des kits commerciaux est sûrement la méthode la moins résolutive au vu des observations en microscopie électronique [223]. L'immuno-capture peut être utilisée pour isoler les sous-populations de VEs dépendamment du marqueur utilisé. Cependant la force de liaison anticorps-antigène rend la dissociation difficile et de ce fait la récupération des VEs pour d'autres applications est limitée. Des méthodes comme la microfluidique ou l'utilisation d'ondes acoustiques semblent très prometteuses, étant donné leur côté novateur. Il faudra attendre d'autres situations d'applications pour avoir le recul nécessaire sur ces méthodes.

1.2.6.2 Caractérisations morphologique et quantitatives

1.2.6.2.1 Techniques basées sur la microscopie électronique

La microscopie électronique est la méthode de référence pour l'imagerie des vésicules avec une résolution d'environ 5 nm pour la microscopie électronique à balayage (MEB) et de 1 à 3 nm pour la microscopie électronique à transmission (MET) (figure 21).

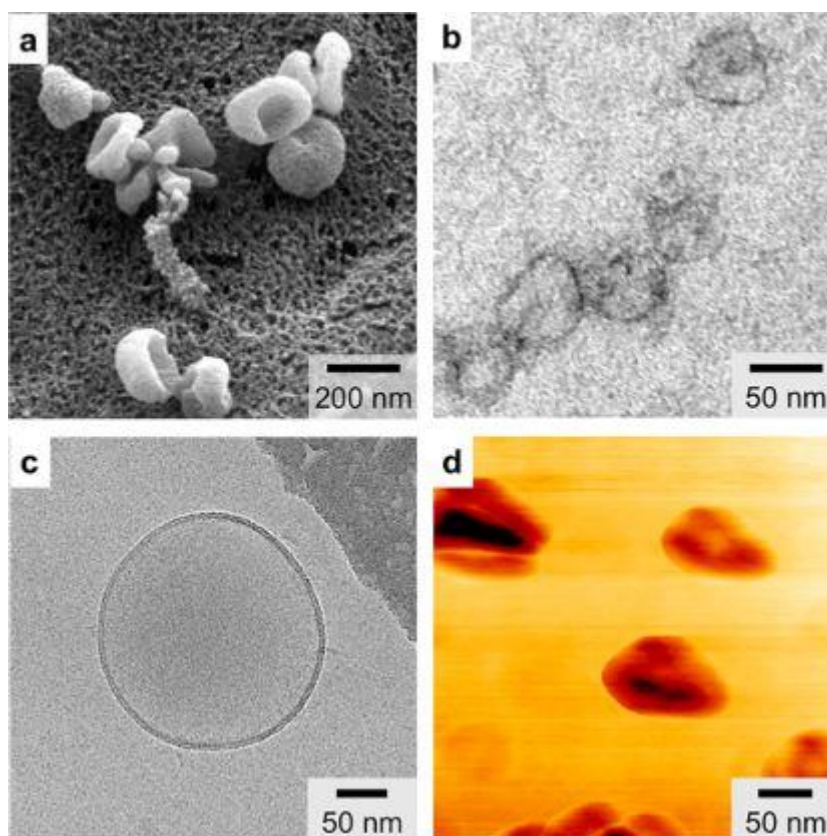


Figure 21 : Différentes micrographies de vésicules extracellulaires. (a) La microscopie électronique à balayage (MEB) fournit des informations tridimensionnelles sur la topologie de surface. (b) La microscopie électronique à transmission (MET) a une résolution d'image supérieure et peut être utilisée avec un marquage immunogold pour fournir une caractérisation moléculaire. (c) La Cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) permet l'analyse de la morphologie de VEs sans traitement extensif. (d) La microscopie à force atomique (MFA) peut fournir des informations à la fois sur la topologie de surface et sur les propriétés constitutives (par exemple, rigidité, adhérence). Réimprimé avec permission de [233]. Copyright 2018 American Chemical Society.

1.2.6.2.1.1 Microscopie électronique à balayage

La MEB est une technique bien connue et maintenant utilisée dans les domaines de recherche sur les VEs [234]. Cette technologie produit des images par balayage de la surface d'un échantillon de VEs avec un faisceau focalisé d'électrons. La surface de l'échantillon réfléchit les électrons pour produire, après acquisition et traitement, une image tridimensionnelle [233]. Les VEs présentent une forme de coupe déformée, un peu comme l'image d'un globule rouge [67].

1.2.6.2.1.2 Microscopie électronique à transmission

La MET est une autre technique de microscopie électronique très utilisée pour caractériser les VEs. L'image est obtenue en focalisant le faisceau d'électrons sur l'échantillon. Les électrons transmis à travers l'échantillon permettent de créer une image de sa structure interne. Cette technique a une résolution supérieure, permettant d'obtenir l'image d'objets de taille pouvant être inférieure au nm. Des métaux lourds tels que le tétr oxyde d'osmium et l'acétate d'uranyle sont généralement utilisés pour générer des contrastes de l'échantillon [67]. Cette méthode peut être associée à l'immuno-détection en utilisant des anticorps couplés à des particules d'or colloïdales de 4 à 40 nm de diamètre [235]. Dans la recherche sur les VEs ces anticorps sont souvent dirigés contre des marqueurs comme les tétraspanines (CD9, CD63, CD81), Alix, TSG101 ou encore des protéines contenues dans les radeaux lipidiques comme les flotillines [236].

1.2.6.2.1.3 Cryo-Microscopie Electronique (cryo-ME)

La cryo-ME est une technique où les échantillons sont analysés après congélation rapide à très basse température (-100 °C), couramment dans l'éthane liquide [237]. Contrairement à la MEB ou à la MET, qui nécessitent une fixation et une coloration étendue de l'échantillon, la cryo-ME permet l'analyse des VEs dans l'échantillon congelé, évitant la déshydratation et l'utilisation de fixateurs chimiques. A l'observation les vésicules apparaissent bien rondes [238].

1.2.6.2.1.4 Tomographie électronique (TE)

La TE est une autre méthode de microscopie électronique dont l'originalité est de déterminer la structure tridimensionnelle (3D) des objets, dont les VEs [239].

Contrairement aux techniques de ME précédemment discutées où les images sont sur deux dimensions (2D), la TE reconstruit l'information 3D à partir d'une série d'images 2D acquises sous différents angles de vue [240]. Les images sont ensuite combinées numériquement pour produire une représentation fidèle de l'objet original. Ce processus exige des images qui fournissent systématiquement une mesure monotone d'une certaine propriété du volume échantillonné dans chaque projection inclinée, ce qu'on appelle l'exigence de projection. La reconstruction résultante consiste en des intensités voxel (une version 3D d'un pixel) présentant la distribution 3D de la grandeur mesurée [241].

1.2.6.2.1.5 Microscopie à Force Atomique (MFA)

La MFA est une technique d'imagerie à haute résolution pour la caractérisation des VEs [242]. La MFA n'exige pas de préparation compliquée d'échantillons, les VEs peuvent être adsorbées sur un support de mica et imagées après séchage doux [233]. La MFA est utilisée pour obtenir deux types d'informations : la première relative à la topographie de la surface reflétée et la deuxième relative à la rigidité locale de la structure détectée et ses propriétés d'adhérence [233]. Les images de MFA topographique montrent une morphologie ronde des VEs, tandis que les images de phase montrent les sous-structures variables qui composent les VEs notamment les lipides et les protéines [242].

1.2.6.2.2 L'analyse NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*)

L'analyse NTA est une technique basée sur un suivi individuel de nanoparticules en suspension dans une solution et permet de déterminer leur taille mais également leur nombre [243]. L'échantillon circule en continu dans une chambre traversée par un faisceau lumineux. Lorsque les particules en mouvement croisent la trajectoire du faisceau, elles diffusent la lumière. Une caméra enregistre le trajet de chaque particule en traquant leur mouvement brownien (figure 22 a). Les informations obtenues permettent de déduire la taille des particules (figure 22b) par calcul mathématique grâce à l'équation de Stokes-Einstein ainsi que leur concentration dans la solution. Si nécessaire, la fluorescence peut être également détectée par le système NTA. Cette fonctionnalité peut être utilisée pour la détection des antigènes présents sur les vésicules extracellulaires en utilisant des anticorps couplés à un fluorochrome et spécifiquement dirigés contre des molécules d'intérêt. Cela peut être particulièrement intéressant dans des applications relatives la caractérisation de sous-types vésiculaires dans un échantillon ou lors de la recherche de changements phénotypiques des VEs passant d'un état physiologique et à un état pathologique [244]. L'avantage d'une analyse avec cette technologie NTA est que l'échantillon peut être récupéré, néanmoins, un volume de 500 μ L est nécessaire pour remplir le système. La NTA permet de donner une idée sur la présence ou non de particules dans les fractions analysées, cependant le système est avant tout un compteur de particules et ne fait aucune distinction entre des vésicules extracellulaires et des protéines agrégées par exemple. Une optimisation précise de la dilution de l'échantillon, du seuil de détection de la caméra et de sa focalisation sont nécessaires pour assurer une bonne mesure.

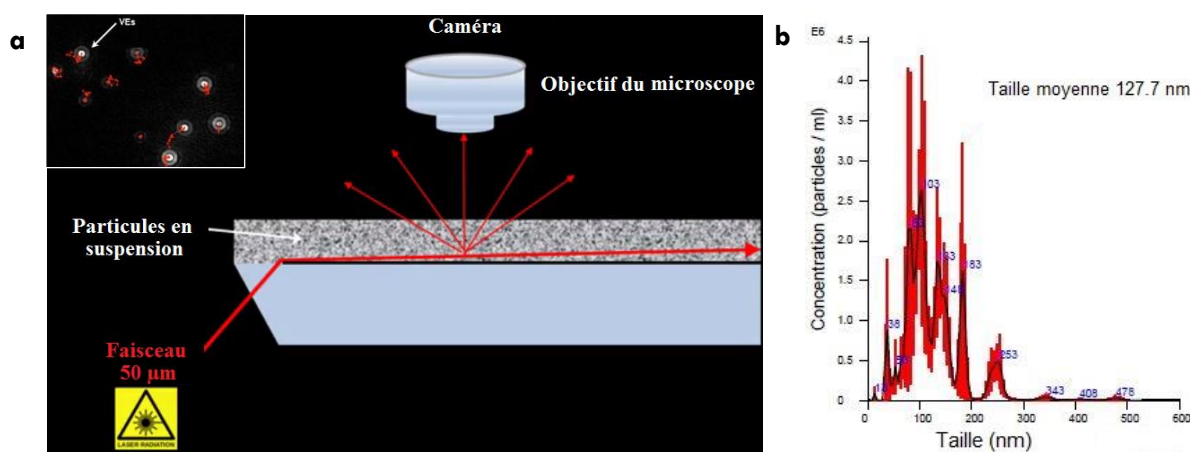


Figure 22 : Quantification des vésicules extracellulaires par NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). (a) La conception instrumentale utilise une source de lumière laser pour éclairer des particules nanométriques dans un liquide. L'objectif du microscope permet d'ajuster la résolution. Chaque particule qui traverse la trajectoire du laser est détectée par la caméra et sera quantifiée. L'encart de la figure (a) montre les particules individuelles sous la forme de dispersions ponctuelles se déplaçant en suivant un mouvement brownien (en rouge). (b) Cette information est ensuite utilisée par le logiciel pour déterminer la concentration en vésicules (particule/ml) et la distribution de taille (nm). Panel (a) réadapté du cours *Basics of Extracellular Vesicles* (coursera).

1.2.6.2.3 L'analyse TRPS (*Tunable Resistive Pulse Sensing*)

Les analyses par TRPS peuvent être une alternative à l'analyse par NTA pour mesurer la concentration et la distribution granulométrique des VEs [245]. La technologie est basée sur la détection de changements transitoires d'un courant ionique, générés par le transport de vésicules au travers d'un nanopore percé dans une membrane en polyuréthane. Récemment, Akers et collaborateurs ont comparé le rendement du NTA et du TRPS en analysant des exosomes et des microvésicules dérivés du liquide céphalorachidien de patients atteints de glioblastomes [246]. Les auteurs ont noté que pour les VEs dont le diamètre est inférieur à 150 nm, l'analyse NTA détecte systématiquement plus de VEs qu'avec une analyse TRPS. Pour les VEs de plus grande taille (>150 nm) c'est l'inverse. Ainsi, pour une bonne caractérisation des vésicules contenues dans un échantillon biologique quel qu'il soit, il semble impératif de combiner plusieurs stratégies et de profiter des avantages qu'offre chaque technique [246].

1.2.6.3 Etudes protéomiques

La caractérisation du cargo protéique des vésicules extracellulaires est un pas conséquent non seulement dans la compréhension de la biogénèse, le tri, l'adressage, le relargage et l'internalisation des vésicules extracellulaires mais également dans leur utilisation en tant que biomarqueurs. Le challenge de l'étude des vésicules extracellulaires, particulièrement du contenu protéique, est double : d'une part les échantillons sont généralement en quantité limitée et les techniques d'isolement qui tendent vers une spécificité élevée souffrent d'un rendement moindre. Ce problème est particulièrement récurrent dans les études de diagnostic clinique, avec le traitement d'échantillons "précieux" issus de patients. D'autre part, la taille des VEs est à l'échelle du nanomètre rendant vite leur détection limitée. Néanmoins, l'engouement lié au domaine des VEs ces dix dernières années, a également eu un effet positif sur le développement technologique. Des nouveaux appareils sont arrivés sur le marché et se sont plus ou moins adaptés aux contraintes précédemment citées.

1.2.6.3.1.1 Western blot (WB) et ELISA

Dans l'étude des protéines vésiculaires, la technique du western blot est sans doute la plus couramment utilisée pour démontrer la présence de protéines spécifiques comme par exemple des marqueurs vésiculaires connus. Dans ces études, les préparations vésiculaires purifiées sont traitées avec des solutions de lyse tamponnées en condition dénaturante ou non selon les molécules recherchées ou les anticorps utilisés. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), avant d'être transférées sur une membrane, souvent de nitrocellulose. Après saturation, les membranes sont incubées en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Un anticorps secondaire marqué dirigé contre l'anticorps primaire permet de révéler la présence éventuelle de la protéine [247]. Cette méthode apporte des informations complémentaires sur la taille relative de la protéine.

Comme pour le western-blot, le dosage ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) est une autre technique courante dans l'étude des protéines et peut être utilisée dans différentes configurations : direct, indirect, en sandwich ou par compétition [248].

A titre d'exemple d'application à l'étude des vésicules extracellulaires, dans la configuration sandwich, les VEs isolées ou leur lysat sont mis en contact direct avec un anticorps immobilisé sur un support solide qui joue le rôle de capteur à vésicules. Un second anticorps biotinylé,

reconnaissant les VEs capturées, est utilisé pour les détecter [249]. Les deux anticorps de capture et de détection sont non interactifs, ce qui améliore la détection.

Les deux techniques présentées sont équivalentes en termes de limite de détection et de résultats. Elles dépendent de l'efficacité et de la spécificité des anticorps. Cependant, pour des raisons de rapidité, le test ELISA semble plus adéquat pour des études à haut débit comme par exemple dans le cas d'applications cliniques.

1.2.6.3.1.2 Spectrométrie de masse

Contrairement au WB et à l'ELISA qui quantifient des protéines ciblées à une échelle relativement restreinte, la spectrométrie de masse permet un profilage peptidique à haut débit [250]. Les protéines des VEs isolées sont digérées enzymatiquement. Les peptides recueillis sont ensuite séparés par chromatographie liquide et ionisés pour être analysés par spectrométrie de masse. Tout au long de ce processus, de multiples étapes affectent de manière critique le profilage protéomique des VEs. Outre la purification efficace des VEs [61] en choisissant la bonne méthode permettant d'éviter au maximum la contamination par des protéines non vésiculaires, le choix de l'analyse en masse et les performances du spectromètre de masse utilisés sont autant de facteurs à prendre en considération [64,235]. L'analyse par spectrométrie de masse caractérise des fragments peptidiques: une identification, une quantification et une validation appropriée des peptides générés sont donc nécessaires [251]. La pertinence des données protéomiques dépend de la stringence des filtres appliqués mais également de la pertinence des bases de données consultées lors de l'analyse des données brutes. En effet, les bases de données ne sont pas toutes mises à jour régulièrement pour reclassifier les protéines répertoriées. Pour des études spécifiques de protéines d'intérêt, il est parfois recommandé d'effectuer des validations par d'autres types d'analyses complémentaires comme le WB [233]. Bien que la spectrométrie de masse exige un temps de préparation et de traitement important de données, elle peut fournir des analyses protéomiques à haut débit, quantitatives et comparatives de VEs. Plusieurs milliers de protéines vésiculaires ont été caractérisées par spectrométrie de masse [250,252] et regroupées dans des bases de données dédiées tel que Vesiclepedia [192], EVpedia [193] et ExoCarta [194]. Ces études permettent également de dresser des cartes d'interactomes basées sur la nature du cargo protéique des vésicules analysées [253].

1.2.6.3.1.3 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a toujours été une technique robuste pour caractériser de grandes cellules ou des entités micrométriques. Son principe repose sur la diffusion de la lumière et l'activation par fluorescence, chaque molécule détectée étant comptabilisée comme un événement. Les cytomètres en flux conventionnels ont une sensibilité et une résolution limitées pour détecter les petites particules d'un diamètre inférieur à 500 nm [254]. Pour adapter la cytométrie en flux conventionnelle à l'étude des VEs, ces dernières sont couplées à des billes de latex de taille micrométrique. Les VEs liés sont ensuite marquées avec des anticorps fluorescents [255].

Cette approche est en principe très efficace pour détecter, dénombrer et étudier les phénotypes vésiculaires [256]. Néanmoins, la présence d'anticorps aggrégées [257], de microprécipités inorganiques [258] ou de lipoprotéines [227] sont autant d'artefacts susceptibles de perturber les résultats des analyses. Des optimisations sur la sensibilité des appareils actuels sont nécessaires pour générer des résultats plus fiables.

1.3 Emergence autour des fonctions vésiculaires : accent sur les VEs d'origine microgliale

1.3.1 Les vésicules extracellulaires dans les pathologies du SNC

Avec les preuves croissantes que les vésicules extracellulaires contiennent un cargo biologiquement actif et qu'elles ont un effet sur les cellules réceptrices, leurs applications cliniques se sont considérablement développées [259]. L'enjeu est de les utiliser de manière non invasive comme biomarqueurs dans la détection de pathologies comme dans le cas des maladies neurodégénératives.

Les maladies neurodégénératives représentent de plus en plus une cause de décès à l'échelle mondiale [260]. Elles sont parfois liées au fait que des protéines mal conformées ne sont pas correctement éliminées et s'accumulent progressivement au niveau du cerveau. Il en résulte des pathologies qui réduisent les facultés cérébrales et physiques des personnes atteintes. Les investigations de ces protéines dans les vésicules extracellulaires laissent penser qu'elles seraient transportées par les VEs [261]. Des agrégats de protéines toxiques tels que la α synucléine, la protéine Tau ou la protéine bêta-amyloïde, ainsi que des protéines pathogènes prioniques ont été décrites comme transportés dans les VEs [262] fournissant un argument pour l'implication pathologique d'échanges cellulaires *via* les vésicules extracellulaires dans des troubles neurodégénératifs. La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif d'apparition tardive provoquant une perte de mémoire et des capacités cognitives. Bien que tout n'est pas encore connu sur la MA, il est clair que l'accumulation du peptide β -amyloïde dans des plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires de la protéine Tau sont des éléments importants dans la progression de la maladie [263]. Le peptide β -amyloïde résulte du processus protéolytique du Précurseur de la Protéine Amyloïde (APP) [264]. Celui-ci peut avoir différentes localisations cellulaires et, de manière intéressante, dans les voies de recyclage vésiculaire endosomales, processus en commun avec la biogénèse et la formation des vésicules extracellulaires [265]. Rajendran et collègues ont ainsi déterminé que les peptides bêta-amyloïdes sont transportés dans des corps multivésiculaires. Les protéines exosomales peuvent alors s'accumuler dans les plaques amyloïdes qui se forment dans le cerveau de patients atteints de MA, suggérant un rôle des vésicules extracellulaires dans la propagation de la maladie [266]. Dujardin et collègues ont également démontré la présence de la protéine Tau dans les vésicules extracellulaires. Dans des conditions physiologiques Tau

serait uniquement détectée dans les ectosomes alors que lorsque la protéine est surexprimée, Tau serait associée aussi bien aux ectosomes qu'aux exosomes [267].

1.3.2 Un dialogue cellulaire médié par les VEs dans le SNC

Le dialogue neurone-glie au sein du SNC peut s'établir au travers des contacts directs ou par des voies paracrines. Parallèlement, les VEs par l'intermédiaire de leur cargo biologiquement actif, peuvent véhiculer des informations vers les cellules réceptrices [262,268]. En particulier, les cellules microgliales sécrètent des vésicules extracellulaires [111] et ont aussi la capacité d'internaliser des VEs provenant d'autres cellules du SNC (figure 23) [4,113,262].

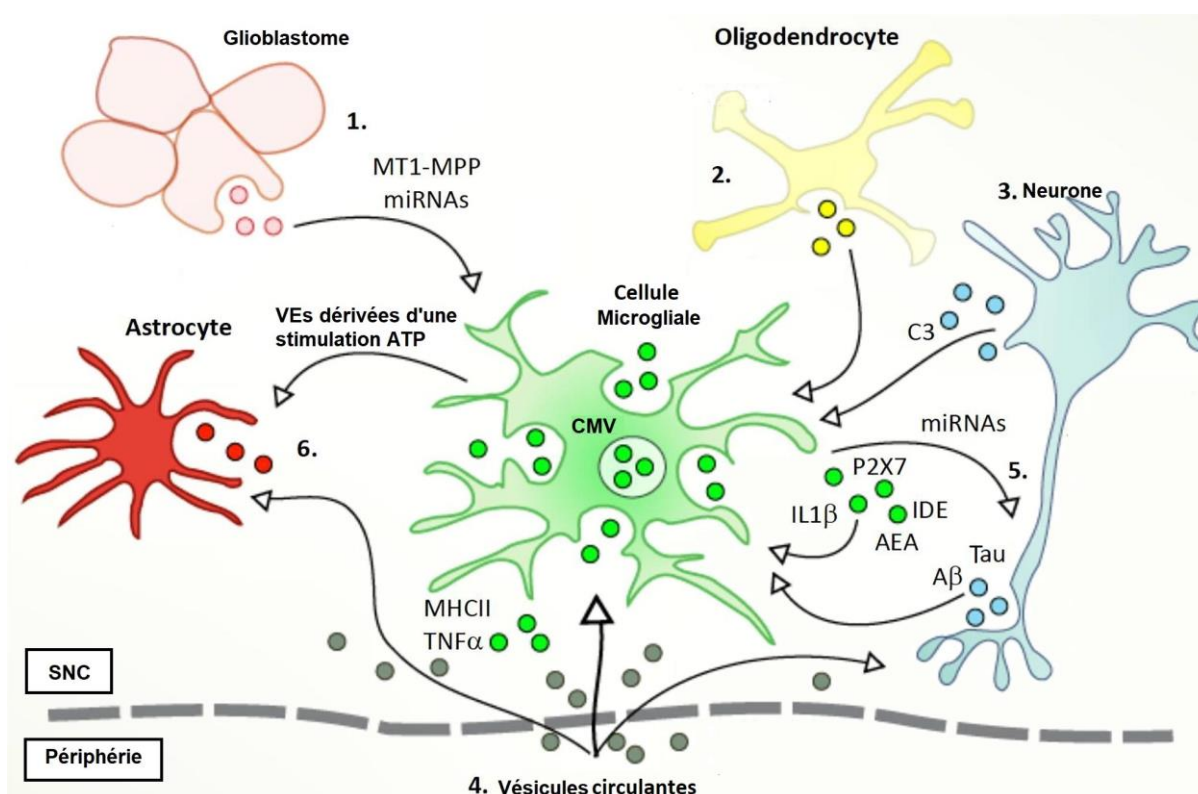


Figure 23 : Dialogue médié par les vésicules extracellulaires de et vers les cellules microgliales. La microglie en tant que cellules réceptrices pour des VEs de différentes origines : 1. Les VEs dérivées de glioblastome contiennent des métalloprotéases (MT1-MMP) modulant la fonction microgiale et des microARN (miRNA); 2. Les VEs dérivées d'oligodendrocytes sont adressées vers la microglie pour être éliminées; 3. Les vésicules neuronales contenant du C3 peuvent favoriser l'élagage synaptique. Les VEs contenant le peptide bêta amyloïde (Aβ) et la protéine Tau peuvent être internalisées par la microglie. 4. Les VEs circulantes ciblent de préférence la microglie dans le SNC. La microglie en tant que source de vésicules : libération de VEs dépendante de l'ATP, qui contiennent des miARN et des cytokines, ciblant (5) les neurones et (6) les astrocytes. Un certain nombre d'agents favorisant la libération de VEs par la microglie ont été décrits comme les LPS (lipopolysaccharides) qui induisent la présence dans les VEs sécrétées de cytokine IL-1β et de miR155 acteurs importants de la réponse proinflammatoire. Une stimulation par l'α-synucléine augmente la sécrétion de vésicules qui expriment le CMH-II (*Complexe Majeur Histocompatibilité de type II*) et TNF-α (*Tumor Necrosis Factor- α*) ayant tous les deux des capacités proapoptotiques.

1.3.2.1 Vésicules sécrétées par les cellules microgliales

Plusieurs études ont signalé l'existence de vésicules extracellulaires d'origine macrophagique et microgliale [269–271]. Les VEs dérivées de la microglie sont des régulateurs importants de la transmission synaptique car ils favorisent la production de céramide et de sphingosine par les neurones [272]. Le métabolisme accru des sphingolipides affecte positivement la neurotransmission *in vitro* et *in vivo*, en soutenant une modulation physiologique de l'activité synaptique par la microglie [272].

Les analyses protéomiques ont permis de caractériser la teneur en protéines des exosomes dérivés de la microglie, décrivant plusieurs enzymes, chaperones, tétraspanines et récepteurs membranaires. Ce contenu est disponible dans les banques des données dédiées aux VEs [192–194]. Des études ont identifié des marqueurs uniques pour les exosomes dérivés de la microglie, tels que l'aminopeptidase APN ou CD13 et le transporteur de lactate MCT1 (*Monocarboxylate transporter 1*) [273]. Il faut toutefois considérer que l'activité biologique et la composition des VEs dépendent de chaque étape du processus d'isolement et de l'état des cellules mères, des stimuli extracellulaires potentiellement utilisés et des voies de signalisation activées [274].

En cas d'infection, les cellules microgliales s'engagent rapidement dans une réponse pro-inflammatoire qui vise à neutraliser l'agent pathogène. La microglie transfectée avec Nef, facteur négatif du virus de l'immunodéficience humaine, libère des exosomes contenant le facteur Nef. Ceci a pour conséquence de perturber l'intégrité et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et favoriser la sécrétion microgliale de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et IL-12 [275].

Les stimuli microgliaux qui augmentent la sécrétion de vésicules extracellulaires ont été largement étudiés. L'ATP extracellulaire a été identifiée comme un facteur majeur stimulant l'excrétion vésiculaire par la microglie à travers les récepteurs P2X7. Plusieurs articles scientifiques indiquent que les VEs microgliales induites, suite à une activation par l'ATP, sont enrichies en IL-1 β et en GAPDH (D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), favorisant ainsi la propagation et la régulation de la réponse neuroinflammatoire et/ou la stimulation de la neuritogenèse dans le cerveau [276]. Par ailleurs, la libération de vésicules chargées de récepteurs P2X7 fonctionnels pourrait représenter une stratégie efficace pour la microglie de réduire la présence de ces récepteurs sur leur membrane plasmique, réduisant ainsi l'apoptose induite par P2X7 [274].

La stimulation par les lipopolysaccharides (LPS), composants de la paroi de bactéries à Gram négatif, augmente de manière significative la libération de microvésicules par la microglie, dont le contenu est enrichi en cytokine proinflammatoire IL-1 β et en miR-155, un microARN stimulant les réponses pro-inflammatoires [277]. La neuroinflammation joue un rôle critique non seulement dans le cas d'infections, mais aussi lors de lésions cérébrales traumatiques, souvent appelées TBI de l'anglais *Traumatic Brain Injury* où, si elles sont prolongées, peuvent provoquer des lésions neuronales. Dans les phases aiguës et chroniques qui suivent le TBI, les cellules microgliales sont impliquées dans une réponse inflammatoire complexe. Tandis que des études récentes montrent, que suite à un TBI, les VEs dérivées de la microglie commutent vers un profil d'expression anti-inflammatoire favorisant la réparation tissulaire [278]. D'autres auteurs rapportent qu'elles favorisent la neuroinflammation et donc un effet neurotoxique [277]. Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer par la variabilité dans le temps de la réponse microgliale ou par la présence de plusieurs sous populations cellulaires qui exercent des fonctions différentes. Des nouvelles investigations sont nécessaires pour clarifier cet aspect.

1.3.2.2 Vésicules internalisées par les cellules microgliales

Les études rapportées ci-dessus montrent bien que les VEs d'origine microgliale impactent le fonctionnement des cellules du SNC, mais le contraire est aussi vrai : en effet, les cellules microgliales sont à leur tour influencées par les VEs des cellules environnantes. A titre d'exemple, une dépolarisation potassium dépendante des neurones libère des exosomes [279], ceux-ci régulent positivement la molécule du complément C3 dans la microglie. Les cellules microgliales activées, éliminent les neurites en dégénérescence [280]. Les exosomes sécrétés par les oligodendrocytes, cellules du SNC responsables du processus de myélinisation, sont transférés vers la microglie par le mécanisme de macropinocytose et acheminés vers le lysosome pour y être dégradés. Ils pourront ensuite servir de support trophique aux axones [113,268,281,282].

Dans les glioblastomes, formes les plus connues et les plus dévastatrices de tumeurs cérébrales, les cellules microgliales primaires humaines internalisent les VEs dérivées du glioblastome. Cela induit l'expression de MT1-MMP (*Membrane type 1-Matrix Metalloproteinase*), marqueur de glioblastomes connu pour être favorable à la tumorigenèse. Le fait de retrouver ce marqueur dans les cellules microgliales traduit un mécanisme possible utilisé par les cellules tumorales pour la communication inter-cellulaire à longue distance permettant de modifier à leur avantage la réponse immunitaire locale et favoriser la propagation de la tumeur [283].

Introduction

Les affections qui entraînent une réponse immunitaire périphérique sont souvent associées à une inflammation du système nerveux central suggérant une communication entre les deux systèmes immunitaires. Le mécanisme sous-jacent de cette relation reste largement inconnu.

Les cellules microgliales semblent être à l'interface entre le système nerveux central et périphérique. En effet, des études ont montré que les cellules microgliales seraient la cible de vésicules extracellulaires circulantes [284]. En utilisant le modèle d'endotoxémie avec le LPS, le rôle des exosomes dérivés du sérum dans la médiation neuroinflammation a été étudié. Les exosomes circulants dans le sérum de souris stimulées par le LPS, ont été injectés par voie intraveineuse à des souris adultes normales. Les souris ayant reçu ces exosomes présentent une activation microgliale élevée, de manière temporelle et dose dépendante. De plus, cette activation n'induit pas de perturbation de la BHE [284]. Cette étude montre que les vésicules sont préférentiellement internalisées par les cellules microgliales, en comparaison avec les astrocytes et les neurones.

OBJECTIF DE LA THESE

De nombreuses pathologies du système nerveux central (SNC) sont étroitement associées à une dégradation massive des cellules nerveuses, conduisant à une perte de leur fonction. L'état inflammatoire est parmi les facteurs impliqués dans ces dégénérescences. Les données bibliographiques montrent une implication des cellules microgliales dans le contrôle de l'homéostasie du SNC [7,285,286]. L'activation de la microglie résidente se manifeste entre autre par un changement de morphologie, passant d'une forme ramifiée à une forme rétractée dépourvue de filopodes [11,22]. Le nombre de cellules microgliales activées peut augmenter sur un site de lésion suite à un traumatisme, une infection ou un état pathologique [1].

La sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*, est un modèle reconnu pour l'étude du SNC. Cet animal a la capacité de régénérer son SNC [287] après lésion expérimentale de la chaîne nerveuse, retrouvant ses capacités sensitives et motrices. La chaîne nerveuse est ventrale et présente une variété cellulaire moindre par rapport au SNC des mammifères, rendant plus aisée l'étude de la physiologie et des interactions cellulaires [16]. De façon intéressante, la possibilité de se placer dans des conditions de culture de la chaîne nerveuse *ex vivo*, permettent de réaliser des études ciblées sur les cellules microgliales résidentes et leur dialogue avec les neurones [16].

La sécrétion de vésicules extracellulaires (VEs) est un des processus qui permet la communication cellulaire [288,289]. Dans ce dialogue, la cellule émettrice est capable d'adresser des vésicules contenant des lipides [290], des protéines [291] et des acides nucléiques [292] pouvant modifier la physiologie de la cellule réceptrice [144].

Mon projet de thèse repose sur l'étude des vésicules extracellulaires (VEs) d'origine microgliale. Le premier objectif a été de construire les outils nécessaires afin de valider la présence de ces nano particules chez le modèle *Hirudo medicinalis* et de s'assurer de leurs origines microgliales. Le deuxième objectif est l'étude de leur contenu protéomique par des stratégies reposant sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Enfin, l'effet fonctionnel des VEs, dans un contexte neuroprotecteur notamment par l'induction de la croissance neuritique *in vitro* aussi bien sur des neurones de sangsue que sur des lignées mammifères a été testé.

MATERIEL ET METHODES

1.1 Dissection du système nerveux central de la sangsue

L'étude a été faite sur un modèle annélide : la sangsue médicinale (*Hirudo medicinalis*), en accord avec la législation française, le traité européen et la déclaration d'Helsinki relatifs à l'utilisation de cette espèce en recherche. Les sangsues, achetées chez Biopharm (Hendy, United Kingdom), sont reçues au même stade de développement et sont maintenues en élevage dans des aquariums une semaine à jeun et à température ambiante avant dissection.

Pour chacun des réplicas, 20 sangsues ont été disséquées. La première étape consiste à anesthésier les animaux avec un passage dans de l'éthanol 10% pendant 20 minutes à température ambiante. Une fois endormies, individuellement les sangsues ont été fixées à l'aide d'épingles sur leur face dorsale. Une section médio ventrale a été effectuée afin de mettre en évidence la chaîne nerveuse (CN) protégée par un sinus sanguin. Ce dernier, a été sectionné par des micro-ciseaux afin de libérer la CN.

Une série de bains a ensuite été effectuée. Dans un premier temps, les chaînes ont été passées dans du tampon stérile de Ringer (115 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂, 4 mM KCl and 10 mM de TRIS maléate à pH 7,4) avant d'être transférées dans du tampon phosphate salin (PBS, Gibco™) contenant des antibiotiques (pénicilline/streptomycine 10000 U/ml et gentamycine 10 mg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA). Les CNs y ont été rincés trois fois à des concentrations décroissantes d'antibiotiques (4x, 2x, 1x). La durée de chaque bain est de 10 minutes à température ambiante. Afin d'isoler le contenu cellulaire des CNs, une dissociation mécanique à l'aide d'une pince fine et de micro-ciseaux a été réalisée. Cette étape a été exécutée sous loupe binoculaire dans une boîte de pétri de 35 mm contenant du milieu L-15 complet (Leibovitz's L-15 medium, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) contenant 2 mM de L-glutamine, 100 UI/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 100 µg/ml gentamycine, 0,6% de glucose, 10 mM Hepes et 10% de sérum de veau fœtal déplété en exosomes (Exo-FBS) (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) (Figure 24a).

1.2 Cultures cellulaires

1.2.1 Culture primaire des cellules microgliales et des neurones de sangsue

Afin de séparer les cellules microgliales des neurones, nous nous sommes basés sur leur différence physique. En effet, la taille des neurones varie entre 6 μm et 70 μm , quand les cellules microgliales ne dépassent pas les 5 μm . De ce fait, une étape de filtrations à travers des tamisages PluriSelect[®] (Leipzig, Allemagne), dont le diamètre des pores laisse passer les cellules microgliales et retient les neurones, a conduit à une séparation nette des deux populations.

Dans un premier temps, le milieu de dissociation contenant le mélange cellulaire a été passé à travers un filtre dont le diamètre des pores est de 100 μm . Le but étant d'éliminer les gros débris cellulaires ainsi que les résidus de la chaîne nerveuse issus de la capsule conjonctive. L'éluat résultant de cette étape est ensuite filtré à travers des pores de 6 μm . A ce stade, les cellules microgliales ont été éluées et les neurones retenus sur le filtre. Avant mise en culture, les cellules microgliales ont été centrifugées à 1200 g pendant 10 min à 15°C pour éliminer les débris résiduels provenant du milieu de dissociation. Après la centrifugation, le culot a été repris dans 5 ml de milieu L-15 complet à température ambiante. L'homogénat a été reparti sur des plaques 4 puits à raison de 500 μL par puits et maintenu en culture pendant 4 jours à température ambiante dans une chambre humide à 15°C. Ces conditions de culture ont été validées et désormais utilisées en routine dans notre laboratoire pour des cellules issues de la chaîne nerveuse de sangsue (Figure 24a).

La population neuronale chez la sangsue étant hétérogène, elle-même a été séparée d'abord par un filtre de 60 μm permettant d'éliminer les gros neurones et ensuite à travers un filtre de 20 μm pour avoir une population neuronale entre 6 et 20 μm . Cette dernière a été reprise dans 2 ml de milieu L-15 complet et a été mise en culture dans des LabTek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) avec un revêtement PolyD-Lysine afin d'être utilisée pour les tests fonctionnels médiés par les vésicules extracellulaires (VEs). Le milieu de culture ainsi que les facteurs stimulants ont été renouvelés tout les 4 jours.

1.2.2 Culture des lignées de mammifères

Les PC-12 sont des phéochromocytomes de la médullosurrénale de rat. Cette lignée a été cultivée dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoTM) complété de 10 % de sérum de cheval décomplémenté (HS, GibcoTM), 5% de FBS décomplémenté (SVF, GibcoTM), 2mM de L-glutamine et des antibiotiques streptomycine et pénicilline avec des concentrations de 10 $\mu\text{g/mL}$ et 10U/mL respectivement. Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm^2 . Une fois les cellules arrivées à confluence, deux rinçages au PBS (Phosphate Buffer Saline)

Materiel et méthodes

sont effectués, puis les cellules sont détachées à l'aide de trypsine-EDTA 0,25 % pendant 2 minutes à 37°C, centrifugées à 1200g, comptées en cellules de Malassez puis transférées en boîte 24 puits à une densité de 60, 120 ou 200 cellules/puits. Les cellules ont été maintenues 24h dans le milieu précédemment décrit puis passées dans un milieu avec uniquement 0.1% de sérum de cheval décomplémenté pour favoriser la différenciation au profit de multiplication. Les SH-SY5Y, cellules de neuroblastomes humains. Cette lignée a été cultivée dans les mêmes conditions utilisées pour les PC-12. Après trypsinisation et comptage les cellules ont étéensemencées en boîtes 24 puits à différentes densités $2,2 \times 10^4$, $4,4 \times 10^4$ ou $8,8 \times 10^4$ cellules/puits. Les cellules ont été maintenues 24h dans le milieu précédemment décrit puis ce dernier a été changé pour favoriser la différenciation. C'est ainsi que les cellules ont été maintenues 72h dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoTM) complété de 2mM de L-glutamine et des antibiotiques streptomycines et pénicilline avec des concentrations de 10 µg/mL et 10 U/mL respectivement, 1% d'acides aminés non essentiels et de 25 mM de staurosporine, agent de différenciation utilisé dans ces expériences.

1.3 Isolement des vésicules extracellulaires microgliales

Au terme des 4 jours de culture, le milieu conditionné des cellules microgliales de sangsue a été récupéré afin d'en isoler les VEs.

Une série de centrifugations différentielles a été appliquée. Les cellules microgliales ont été culotées à 1200 g pendant 10 minutes, ensuite le surnageant (S1) a été centrifugé à la même vitesse 20 minutes supplémentaires dans le but de culoter les corps apoptotiques. Une étape de filtration sur des filtre dont la porosité est de 0.22 μm , a été effectuée sur le surnageant S2, ce qui permet d'éliminer les débris et corps apoptotiques résiduels. L'éluat a été ensuite transféré dans des tubes polycarbonate de 10.4 mL (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Les tubes ont été complétés à $\frac{3}{4}$ de leurs capacités avec du PBS et ultracentrifugés dans le rotor 70.1 Ti k-factor 36 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) à 100000 g pendant 90 minutes en utilisant une ultracentrifugeuse Beckman Optima XPN. Cette étape a permis de culoter les vésicules extracellulaires (culot-UC). L'ensemble des étapes de centrifugation a été réalisé en conditions stériles, la température des centrifugations a été fixée à 4°C pour toute la durée de la manipulation (Figure 24b).

Le culot-UC a été repris dans 200 μL de PBS pour être analysé directement (quantification des nanoparticules, analyse de la morphologie par microscopie électronique ou étude du cargo protéique par spectrométrie de masse) ou soumis à une étape de purification supplémentaire en gradient de densité Optiprep™. Dans ce cas, les VEs culotées après ultracentrifugation ont été reprises dans 200 μL de PBS et déposées en bas d'un gradient discontinu d'Optiprep™ (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le gradient a été obtenu après dilution de la solution mère (60% p/v d'iodixanol) en utilisant comme tampon d'homogénéisation 0,25 M de sucrose, 1 mM d'EDTA, 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4 [293]. Quatre concentrations (40%, 20%, 10% et 5%) d'Optiprep™ d'un volume de 2mL chacune ont été utilisées. Les différentes solutions ont été délicatement déposées dans un tube polyallomer de 14 mL (Beckman Coulter). Le dépôt a été fait dans un ordre décroissant de la contenance en Optiprep™ (Fig 1b). Un tube contenant exactement les mêmes strates de gradient et préparé avec les mêmes tampons que le tube contenant les VEs a été intégré à l'expérience (contrôle négatif). Les tubes ont été ultracentrifugés pendant 16h à 100000 g (rotor SW 40 Ti, k-factor 137, Beckman Coulter). Huit fractions Optiprep™ de 1 mL ont été récupérées en partant du haut du gradient et ont été remises en suspension dans 30 mL de PBS (Fig 1c). Une ultracentrifugation des huit tubes pendant 90 min à 100000 g a permis d'éliminer les résidus d'iodixanol dans le surnageant et d'isoler les VEs dans le culot. Ces dernières, nommées de F1 à F8 -F étant fraction- ont été reprises dans 200 μL de PBS et analysées comme décrit précédemment pour le culot-UC.

Matériel et méthodes

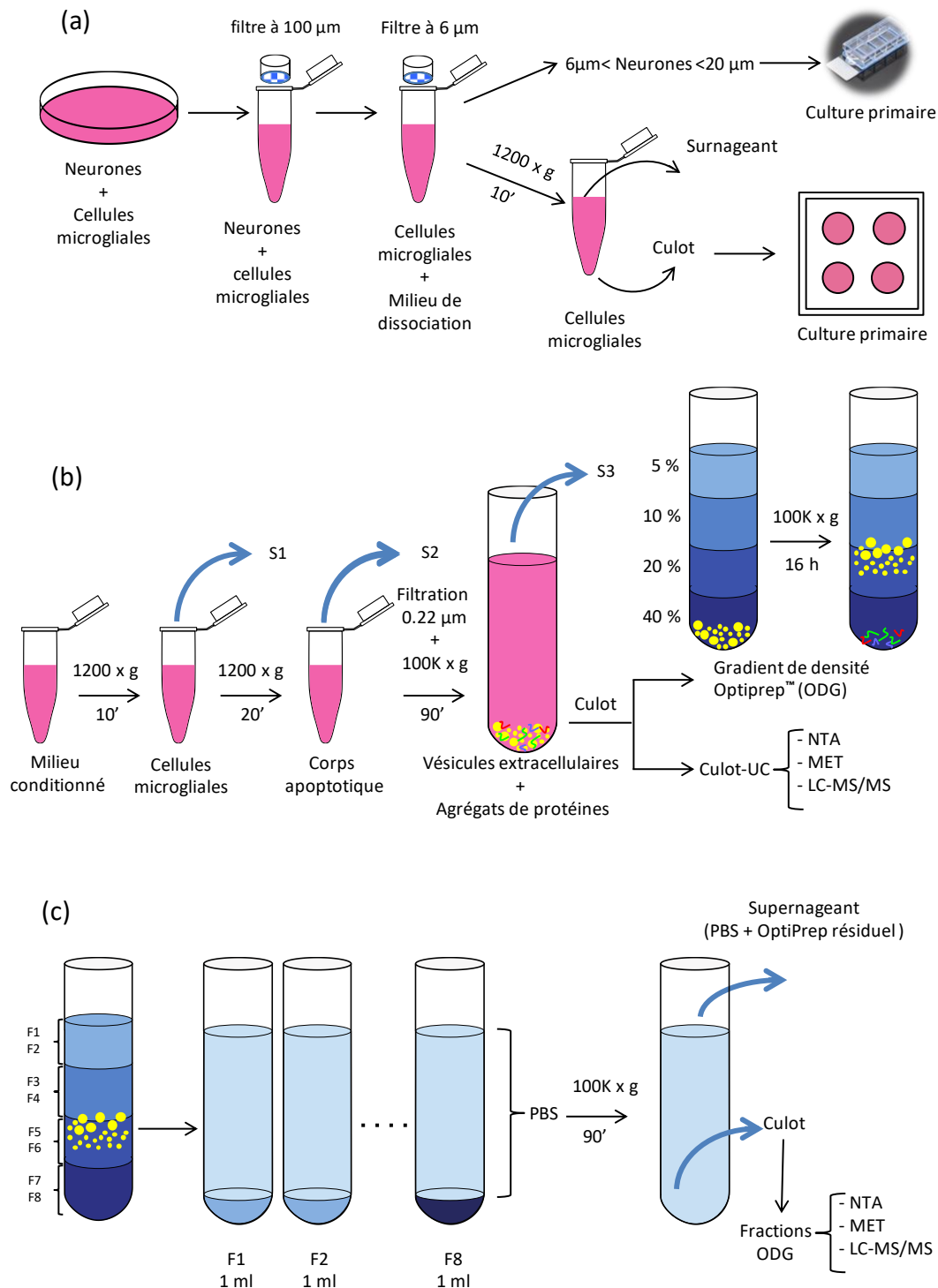


Figure 24 : Stratégies de collecte et d'isolement des vésicules extracellulaires. (a) Les chaînes nerveuses de sangsue ont été disséquées et dissociées mécaniquement. Les cellules microgliales ont été séparées des neurones par filtration et mises en culture. **(b)** Les cellules microgliales et les corps apoptotiques ont été retirés du milieu conditionné par des étapes de centrifugation successives. Les VEs ont été isolées du milieu conditionné par ultracentrifugation différentielle (Culot-UC) ou soumis à une étape supplémentaire de purification sur gradient de densité d'Optiprep™. **(c)** Les VEs ont été collectées dans différentes fractions après la séparation en gradient de densité d'Optiprep™ (fractions F1-F8).

1.4 Quantification des vésicules extracellulaires

Afin de déterminer le nombre de vésicules dans chaque fraction, une quantification suivant la technologie NTA pour *Nanoparticles Tracking Analysis* a été effectuée. Le Nanosight NS-300 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Royaume Uni) équipé d'un laser à 488 nm et d'une pompe à débit automatique a été utilisé à cet effet. Le script d'analyse a été adapté comme suit : les VEs ont été diluées au 1 :100 dans du PBS et chargées dans la cellule d'analyse suivant un flux automatique grâce à la pompe fournie avec l'appareil. Le détail des conditions d'acquisition et d'analyse sont résumées dans le tableau 2. Le PBS utilisé pour reprendre les VEs et réaliser les dilutions, a été intégré comme control négatif pour le culot-UC et analysé pour le nombre de particules qu'il contient suivant le même procédé décrit ci-dessus. Concernant les fractions Optiprep™, c'est le contenu du tube contrôle négatif contenant les différentes strates de gradient sans les VEs qui a été analysé pour quantifier le nombre de particules et a servi de témoin négatif.

Tableau 2 : Détail des conditions d'acquisition et d'analyse pour la quantification NTA

Détail du script	Paramètres de capture	Paramètre d'analyse
Injection : pompe à 1000 - 25"	Caméra : sCMOS	Seuil de détection :
Rééquilibration du flux : 15"	Seuil de caméra : 14	3
Enregistrement : pompe à 25 – 3x 60"	Seringue : automatique	Logiciel : NTA 3.2
Temps mort entre chaque enregistrement : 5"		
Arrêt de la pompe		
Analyse des vidéos enregistrées		

1.5 Observation de la morphologie des vésicules extracellulaire isolées

Afin de vérifier la présence mais aussi la morphologie des vésicules extracellulaires isolées, une observation en microscopie électronique à transmission du culot-UC et des fractions Optiprep™ a été accomplie. A cet effet, nous avons suivi les recommandations de Théry et collaborateurs [67]. En résumé, les vésicules isolées ont été reprises et fixées dans 30 µL de 2% paraformaldéhyde dans du PBS. L'échantillon a ensuite été déposé sur des grilles recouvertes d'une fine pellicule de Formvar-carbone. Le dépôt a été effectué en trois fois, espacé de 20 minutes à raison de 10 µL par dépôt.

A l'issue de cette étape, les grilles ont été transférées pour 5 min dans une goutte contenant 1% de glutaraldéhyde dans le PBS, pour permettre la stabilité des structures durant l'analyse en microscopie électronique. Après plusieurs lavages dans de l'eau ultrapure, les grilles ont été contrastées en utilisant un mélange 4% d'uranyle d'acétate et 2 % de méthylcellulose dans un ratio 1:9, v/v. Cette dernière étape a été exécutée sur glace et dans l'obscurité. L'ensemble de la

procédure de préparation d'échantillons a été faite en déposant les gouttes de tampon sur du parafilm et en y déposant dessus les grilles avec l'échantillon du côté de la goutte. Les grilles ont été déplacées successivement d'une goutte à une autre pour passer d'une étape à une autre. L'excès en réactif a été enlevé avec du papier Whatman.

L'observation des grilles a été réalisée en utilisant le microscope électronique JEOL JEM-2100. Les acquisitions ont été faites avec une caméra Gatan Orius SC200D.

1.6 Etudes du cargo protéique des VEs isolées par Spectrométrie de masse

1.6.1 Annotation des bases de données sanguine

La sanguine médicamenteuse est un modèle pour lequel les outils d'étude ne sont pas encore parfaitement construits et validés. Dans le cadre de l'analyse du cargo protéomique des VEs microgliales, il était primordial d'annoter la banque de données à notre disposition. Cette banque est composée de 22010 séquences génomiques codantes traduites à partir du génome d'*Hirudo* [294]. Dans un premier temps, toutes les séquences ont été alignées contre la banque de données Uniprot [295] en utilisant le logiciel d'alignement BLAST [296]. La banque de données swissprot étant manuellement vérifiée est plus fiable, ce qui en fait une banque de choix pour notre analyse. Dans le but de rajouter de la pertinence aux résultats Blast, seuls les résultats avec une e-value ≤ 0.1 ont été gardés. De plus, un scripte Python a été construit de manière à ne garder pour chaque requête que le meilleur résultat, si ce dernier donnait une entrée "uncharacterized protein", le résultat suivant a été sélectionné. Le but étant que pour chaque requête un nom de protéine y soit assigné. Pour certaine séquence, à cause de leur longueur très petite, une assignation n'a pas pu être attribuée, de ce fait elles apparaissent comme « none » ou bien « uncharacterized protein ».

Pour les besoins de l'analyse avec les logiciels de protéomique, une dernière étape de l'annotation a été d'homogénéiser les espèces où les annotations ont été trouvées. Pour cela, l'espèce *Homo sapiens* a été choisie comme espèce de référence. De ce fait, l'ensemble des identifications non humaines ont été réassignées grâce à l'outil API REST d'Uniprot [295] pour en chercher leurs orthologues humains.

1.6.2 Préparation des échantillons

Les Culots-UC ainsi que les fractions OptiprepTM ont été repris dans 30 μ L de 50 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) contenant 4% de sodium dodécylsulfate (SDS). Les protéines extraites ont été reprises dans du Laemmli (312,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 50 % de glycérol, 10 % SDS, 0,1 % de bleu de bromophénol, 12,5 % de 2- β -mercaptoethanol) dans un

ratio 1:4 v/v et faire migrer pour une séparation sur un gel d'acrylamide 12%, avec du TGS (25 mM Tris, 192 mM Glycine and 0.1% SDS) comme tampon de migration. L'électrophorèse a été faite dans un premier temps à 70 V pendant 15 minutes. Une fois dans le gel de concentration, le voltage a été augmenté à 120 V pour 15 min supplémentaires. Ce processus ne permet pas une séparation franche des protéines, mais un piégeage dans les mailles du gel, ce qui confère une matrice de digestion pour la suite de l'expérience.

Post migration, les protéines ont été fixées par passage du gel pendant 20 minutes dans une solution d'InstantBlue™ (Expedeon, Cambridgeshire, United Kingdom). Chaque piste de gel a par la suite été excisée et coupée en petits morceaux d'environ 1 mm³. Un protocole de digestion trypsique a par la suite été appliqué comme recommandé par Lemand et collègues [297]. En résumé, les pièces de gels ont été successivement lavées dans 300 µL des solutions suivantes : eau Milli-Q®, acétonitrile (ACN 100%), 100 mM NH₄HCO₃ pH 8, ACN/NH₄HCO₃ (1:1 v/v). Chaque étape a duré 15 minutes, à l'issues desquels les solutions ont été retirées et jetées. Un passage final dans de l'ACN 100% pendant 5 min a permis de déshydrater complètement les bouts de gel avant l'étape suivante de réduction/alkylation des ponts disulfures. Afin de favoriser l'action digestive de la trypsine. Pour obtenir une réduction douce des ponts disulfures, 100 µL de dithiothréitol (DTT) à une concentration de 10 mM dans 100 mM d'NH₄HCO₃ pH 8, les protéines ont été mise pendant 1h à 56°C. Cette étape est suivie pendant 45 minutes d'une alkylation de ces mêmes ponts disulfures afin d'éviter leurs reformations. A cet effet, 100 µL de 50 mM d'iodoacétamide (IAA) dans 100 mM NH₄HCO₃ pH 8 ont été utilisés pendant 45 minutes à température ambiantes. Cette dernière étape est réalisée à l'obscurité en recouvrant les tubes d'une feuille d'aluminium car l'IAA est photosensibles. L'excès de DTT et IAA a été retiré et les bouts de gel ont été de nouveau lavés successivement avec 300 µL de 100 mM NH₄HCO₃ pH 8 et d'ACN/NH₄HCO₃ (1:1, v/v) pour une durée de 15 min à chaque fois. Un traitement à ACN 100% pendant 5 minutes permet une déshydratation des bouts de gel avant d'être complètement séchés sous vide grâce au système SpeedVac (Thermo Scientific™ Kits Savant™ SPD111 SpeedVac™).

La trypsine (Promega, Charbonnières, France) a été utilisée comme enzyme de digestion à une concentration de 12.5 µg/ mL dans 20 mM NH₄HCO₃ pH 8. Afin d'éviter l'apparition des pics correspondant à l'autolyse de la trypsine lors de l'étape d'analyse en spectrométrie de masse, une étape passive a été menée pendant 20 minutes sur glace. Un volume nécessaire en enzyme (≈ 50 µL) a été ajouté pour recouvrir les bouts de gels. Ceci permet à la trypsine de pénétrer dans le gel (visuellement les petits morceaux de gel se gonflent) sans pour autant être active car à 0°C la trypsine n'agit pas. A l'issu de cette étape, les tubes ont été transférés dans une étuve

à 37°C, température à laquelle l'activité catalytique de l'enzyme est au maximum. La digestion a été conduite toute la nuit (≈ 15 h).

Le jour d'après, l'action de la trypsine a été bloquée en acidifiant le milieu avec 50 μ L d'ACN en agitation continue pendant 20 min. A cette étape 80 % des peptides de digestion sont récupérés.

Les deux prochaines étapes d'extraction ont été répétées deux fois à raison de 15 minutes à chaque fois. D'abord, en ajoutant 50 μ L d'une solution de 5% acide trifluoroacétique (TFA) dans 20 mM NH_4HCO_3 pH 8. Ensuite, 100 μ L d'ACN 100%. Les tubes ont été maintenus sous agitation à température ambiante.

Après chaque traitement, le contenu du tube a été récupéré, transvasé et cumulé dans un nouveau tube de 0,65 mL à faible rétention (Eppendorf, low binding). Le contenu de ce dernier a été complètement séché sous vide avant d'être repris dans 20 μ L d'une solution d'acide trifluoroacétique 0,1%.

Une étape finale de dessalage avant passage en spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant les cônes C_{18} ZipTips (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les ZipTips ont d'abord été lavés avec 100 % d'ACN afin d'éluer tous les résidus de fabrication et équilibrés avec une solution de 0.1% d'acide formique (AF). Les peptides ont été adsorbés par pipetage (≈ 20 passages). Le principe repose sur la chromatographie de phase inverse. Un passage de nouveau dans une solution 0.1 % d'AF permet d'éliminer les peptides non retenus et d'éliminer les impuretés résiduelles. Enfin, les peptides ont été élués dans un nouveau tube en utilisant une solution ACN : AF 0.1% (80:20 v/v) et séchés complètement sous vide avant d'être repris dans 20 μ L ACN : AF 0.1% (2:98 v/v) et analysés en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Toutes les expériences ont été faites en suivant trois répliques biologiques.

1.6.3 Analyse en spectrométrie de masse

Pour l'analyse par spectrométrie de masse, les échantillons ont été séparés par chromatographie en phase inverse en utilisant le système Thermo Scientific Proxeon Easy-nLC1000 équipé d'une colonne Proxeon (75 μ m ID x 2 cm, 3 μ m Thermo Scientific) et d'une colonne à embout C_{18} (Acclamez PepMap, 75 μ m ID x 15 cm, Thermo Scientific). Les peptides digérés ont été séparés en utilisant un gradient d'1h en concentration croissante d'ACN dans 0,1% d'AF (2 à 30%), le débit appliqué a été de 300 nL/min. Afin de permettre la nébulisation de l'électrolyte, une tension de 1,7 kV a été appliquée par la jonction liquide afin de permettre son électronébulisation, à cet effet la source ESI-nanospray (*Electrospray Ionization*) a été utilisée.

Un spectromètre de masse à haute résolution Q-Exactive™ Thermo Scientific™ a été couplé au système de chromatographie pour analyser les ions générés dans un mode data dépendant. Ceci signifie que seuls les 10 ions les plus intenses (Top 10) ont été sélectionnés pour être fragmentés et analysés en *tandem Mass Spectrometry* (MS/MS). Les analyses MS ont été effectuées en mode positif à un pouvoir de résolution de 70000 FWHM (avec un m/z 400). Un gain automatique de $3e6$ a été choisi. L'état de charge par défaut a été fixé à 2 et le temps d'injection maximal à 120 ms. Une fenêtre m/z entre 300 et 1600 a été choisie pour un scan complet en MS. Concernant, la MS/MS cette fenêtre allait de m/z 200 à m/z 2000. 1 microscan a été acquis à 17 500 FWHM avec une AGC à $5e4$ et une fenêtre d'isolement à m/z 4.0 a été utilisée comme paramètres d'acquisition.

1.6.4 Analyse Bioinformatique

Toutes les données générées en spectrométrie de masse ont été traitées avec le logiciel MaxQuant [298] (version 1.5.1.2) en utilisant le moteur de recherche Andromeda [299]. Les protéines ont été identifiées en confrontant les données de spectrométrie de masse par rapport à la base de données *H. medicinalis* décrite ci-dessus.

Afin d'ajouter de la pertinence aux résultats, plusieurs paramètres ont été appliqués, notamment éliminer des listes d'identification les 262 contaminants couramment détectés et renseignés dans la base de données du logiciel. La trypsine a été renseignée comme étant l'enzyme utilisée pour la digestion avec un seuil de deux clivages manqués. L'acétylation N-terminale et l'oxydation de la méthionine ont été sélectionnées comme modifications variables. La carbamidométhylation des cystéines a été définie comme une modification fixe. Pour les spectres MS, une précision de masse initiale de 6 ppm a été sélectionnée et la tolérance MS/MS a été fixée à 20 ppm pour les données générées suite à une dissociation ayant nécessité une collision à haute énergie. Le taux de faux positifs aussi bien à l'échelle des spectres peptidiques que des protéines a été fixé à 1%. Un minimum de deux peptides, dont un unique, a été défini comme nécessaire pour identifier une protéine. Les quantifications sans marquage (label free quantification) ont été réalisées en conservant les paramètres par défaut de MaxQuant. Afin de générer les diagrammes de Venn, les protéines identifiées ont été traitées par le logiciel Perseus [300] (version 1.6.0.7). Trois filtres ont été appliqués (contaminant potentiel, inverse et seulement identifiée par site) sur la matrice protéique entière. Ensuite, des groupes d'échantillons ont été définis.

Pour étudier l'ontologie génétique (GO term) des protéines identifiées, les listes de protéines obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel de protéomique DAVID. Les paramètres par défaut fournis par le logiciel ont été appliqués.

L'analyse des protéines identifiées dans les fractions ODG-positives (F4, F5, F6) avec le logiciel Funrich [301] a permis d'en savoir plus sur l'interactome de ces vésicules. Le logiciel supprime dans un premier temps les doublons et convertit toutes les identifications protéiques en noms de gènes. La liste est ensuite analysée par le logiciel qui, pour des soucis de lisibilité du réseau, ne retient que ceux qui présentent l'interaction la plus pertinente. A l'issue de l'analyse, un réseau d'interactions est généré ainsi qu'un tableau récapitulatif des voies de signalisation dans lesquelles les gènes ont été classés. Des informations sur la *p value* qui a permis la classification et le nombre de gènes impliqués pour chaque voie est également renseigné.

1.7 Détection des signatures vésiculaires en immunomarquage

Afin de confirmer la présence de vésicules chez la sangsue par des techniques ciblées, nous avons utilisé l'immunomarquage aussi bien en immunohistochimie sur chaîne complète qu'en western blot sur des vésicules isolées. L'ensemble des anticorps utilisés est résumé dans le tableau 3.

1.7.1 Western Blot

Le culot-UC ainsi que l'ensemble des fractions Optiprep™ ont été analysés par western blot pour la présence des mêmes marqueurs vésiculaires précédemment cités (ALIX et Hsp70) en plus du CD9, flotilline-1 et Tsg101.

1.7.1.1 L'électrophorèse en gel SDS-PAGE

Les protéines extraites au SDS 4% ont été reprises dans le Laemmli comme décrit ci-dessus. Le gel de concentration a été fait à 4% d'acrylamide et celui de séparation à 12%. Deux catalyseurs ont été utilisés : l'ammonium persulfate (APS) pour initier la réaction de polymérisation et le tétraméthyléthylènediamine (TEMED) pour accélérer cette réaction. La migration a été effectuée à 70V pendant 15 min puis 120V pendant 1h à 1h30. Le front de migration ainsi que le marqueur de poids moléculaires (Thermo Scientific™ Échelle de protéines précolorée PageRuler™ Plus 10-250kDa) ont permis de suivre la séparation des protéines.

1.7.1.2 Transfert et révélation

A l'issue de la migration, les protéines ont été transférées vers une membrane de nitrocellulose (Nitrocellulose transfert membrane protran BA 83 ; Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Allemagne) en appliquant un courant électrique (Transfert semi-sec, Bio-Rad) du gel en milieu semi-liquide avec du tampon composé de 25 mM Tris, 192 mM glycine et 20% de méthanol. La réaction avec le méthanol étant exothermique, le tampon est préparé fraîchement mais refroidi une demi-heure à 4°C avant d'être utilisé. Le transfert a été effectué à 20 V pendant 25 minutes.

Les membranes ont été saturées pendant 1h à température ambiante, dans une solution à 0,1 M PBS, 0,01% Tween 20 et 5% de lait en poudre avant d'être incubées toute la nuit à 4°C sous agitation en présence des anticorps primaires. L'ensemble des anticorps ont été dilués dans le tampon de saturation (voir ci-dessus) pour arriver à un volume total de 5 mL. A l'issue de l'incubation, les membranes ont été rincées trois fois pendant 15 minutes dans le tampon de saturation puis incubées 1h à température ambiante dans un tampon composé de 0,1 M PBS, 0,01% de Tween 20 (PBS-T) en présence de l'anticorps secondaire couplé à la Horseradish Peroxydase (HRP, Jackson Immunoresearch Laboratories, UK). Deux rinçages de 15 minutes au PBS-T ont été opérés, suivis par un lavage de 15 minutes avec du PBS. La détection des protéines immunomarquées a été observée par le kit de détection ECL (Enhance Chemiluminescent kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le signal luminescent a été révélé en utilisant le système ImageQuant LAS-4000 mini system (Fujifilm, Tokyo, Japan).

1.7.2 Immunohistochimie des chaînes nerveuses de sangsue

Afin de vérifier la présence de vésicules extracellulaires *ex vivo* dans le SNC de la sangsue, des expériences d'immunohistochimie ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre des marqueurs vésiculaires dont ALIX, Hsp-70 et flotilline-1. Les cellules microgliales ont été mises en évidence par l'utilisation du marqueur microglial Iba-1 et les noyaux ont été marqués au Hoechst comme décrit précédemment.

Les chaînes nerveuses de sangsue ont été disséquées à partir d'animaux anesthésiés dans 10% éthanol pendant 10 min à température ambiante. Des morceaux de 4 ganglions ont été prélevés, lésés par écrasement avec une pince fine entre le 3^{ème} et 4^{ème} ganglion afin de favoriser le recrutement des cellules microgliales au site de lésion et cultivés dans un milieu L-15 complet pendant 6h à 18°C. Ensuite, le milieu a été remplacé par une solution de PAF 4% pour une fixation à 4°C pendant 1h. Trois rinçages au PBS ont été effectués avant de laisser les chaînes

Materiel et méthodes

perméabiliser pendant 24h à 4°C dans un tampon contenant PBS-glycine 0,1 M et 1% de triton X-100. Afin de limiter les fixations aspécifiques, a été réalisée une étape de saturation à 4°C pendant 5h avec un tampon composé de PBS-glycine 0,1 M, 1%, Triton X100, 3% sérum d'âne (donkey serum), 1% sérum albumine (BSA) et 1% ovalbumine.

Les morceaux de CN ont été par la suite incubés à 4°C toute une nuit, avec les anticorps primaires repris dans du tampon de saturation. Après trois rinçages au tampon de perméabilisation, les échantillons ont été incubés 1h30 à température ambiante avec les anticorps secondaires adéquats. Les noyaux cellulaires ont été mis en évidence par une coloration au Hoechst 33342 pendant 20 minutes, à 4°C. Les CN sont montées entre lame et lamelle avec une goutte de milieu de montage (Fluorescence Mounting Medium, #S3023Dakos) spécialement conçu pour protéger la fluorescence et limiter la sensibilité aux photons. L'observation des échantillons a été faite en microscopie confocale avec un microscope Zeiss LSM 700.

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour la détection des vésicules

Anticorps primaire	Espèces	Fournisseurs	Références	Concentration ou Dilution	Usage	Taille
Anti-ALIX	Souris polyclonal	Abcam	ab88743	1 µg/ mL 10 µg/ mL	WB IHC	97 kDa
Anti- Hsp70	Souris monoclonal	Abcam	ab2787	1/1000 1/100	WB	70 kDa
Anti-flotilline	Lapin monoclonal	Abcam	ab78178	1/2000	WB	48 kDa
Anti-CD9	Lapin polyclonal	Sigma Aldrich	C9993	1/500	WB	25kDa
Anti-Tsg 101	Lapin monoclonal	Abcam	ab125011	1/1000 1/10000	WB	45 kDa
Anti- <i>Hmlba1</i>	Lapin monoclonal	Proteogenix	Spécifiquement synthétisé <i>Hm</i>	1/5000	IHC	
Anticorps secondaires						
Les anticorps anti-lapin IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, united kingdom; 1/20000) et anti-souris IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch; 1/20000) conjugués à la peroxydase ont été utilisés comme anticorps secondaires pour les expériences de western blot et les anticorps d'âne anti-souris ou anti-lapin couplés à l'Alexa 488 (1/2000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pour les expériences d'immunohistochimie						

1.8 Tests fonctionnels

1.8.1 Culture primaire de neurones de sangsue

Les vésicules extracellulaires microgliales ont été utilisées pour induire *in vitro* la croissance neuritique sur les neurones de sangsue en culture primaire. Grâce à l'utilisation de la station de microscopie Nikon Eclipse Ti2, il a été possible de prendre en photo l'ensemble du puits labtech à l'objectif x10 et d'en générer une image mosaïque. Il était impératif de procéder ainsi, car la croissance neuronale est très variable d'un neurone à un autre chez la sangsue. De plus, dans cette culture primaire il a été difficile d'avoir un phénotype homogène et un effet dose/réponse comparable aussi bien dans une même condition qu'entre les différents traitements. Afin de rester comparatif sans induire de biais expérimentaux, il était important que tous les neurones présentant une adhérence au support et un début de croissance à J6 soient inclus dans l'étude, retrouvés et pris en photo aux trois points de la cinétique (6, 13 et 20 jours de culture) grâce à leur coordonnées dans la mosaïque.

Le plugin Neurite Tracer dans ImageJ a été utilisé pour mesurer la longueur des neurites. Dans ce logiciel, la fonction " Analyze " permet de définir l'échelle en fonction du microscope utilisé et du grossissement au moment de la prise de vue. Dans la présente étude chaque 1,538 pixel ont été convertis en 1 μm . En traçant manuellement chaque neurite, le logiciel converti en temps réel les pixel en longueur. A la fin de l'analyse un tableau récapitulatif de toutes les mesures est généré et sauvegardé sous forme de fichier Excel.

L'ensemble des mesures générées dans le logiciel Neurite tracer ImageJ a été analysé à l'aide du logiciel GraphPad qui permet, grâce à un test statistique «two way anova», de comparer aussi bien les différentes conditions expérimentales listées ci-dessous que les résultats obtenus pour les trois points cinétiques à 6, 13 et 20 jours.

- Contrôle négatif : milieu dépleté en VEs;
- Vésicules extracellulaires : à raison de 10^6 vésicules/puits

1.8.2 Lignées cellulaires mammifères

Dans une approche translationnelle, nous avons voulu déterminer l'effet des VEs de sangsue sur des lignées cellulaires de mammifères. Pour cela nous avons comparé la longueur des neurites entre des conditions où des VEs ont été ajoutées à une condition contrôle sans ajout de VEs.

En absence du compteur de nanoparticule nanosight NS300 au moment des expérimentations sur les PC-12, les vésicules ajoutées pour induire un effet sur la croissance neuritique n'ont pas pu être quantifiées. C'est pour cela que des volumes de VEs contenues dans le culot-UC

resuspendu dans 200 μL de PBS ont été comparés pour leur effet *in vitro* sur les cellules PC-12. Deux volumes ont été testés : 10 et 30 μL de vésicules par puits. Dans le puits control 10 et 30 μL du véhicule (PBS) ont été ajoutés.

Le milieu de différenciation ainsi que le traitement vésiculaire ont été renouvelés au bout de 48h. La culture a été arrêtée au bout de 72h et les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (PAF 4%) (Scharlau, France). Trois rinçages de 10 min au PBS ont été effectués avant de marquer les cellules à la phalloïdine (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz Biotechnology) pendant 30 min à 4°C. Trois rinçages de 10 min au PBS ont été effectués avant que les noyaux cellulaires ne soient marqués au Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) avec une concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 20 min à 4°C.

La longueur des neurites a été mesurée automatiquement par le logiciel NeuriteTracer dans ImagJ. Le logiciel met toutes les images au même niveau de gris, par la suite les corps cellulaires sont écartés de la mesure et un traçage des neurites est généré et exprimé en valeurs chiffrées (figure 25). Ces valeurs nous ont permis de représenter l'effet des vésicules extracellulaires sur les PC-12 en forme d'histogramme.

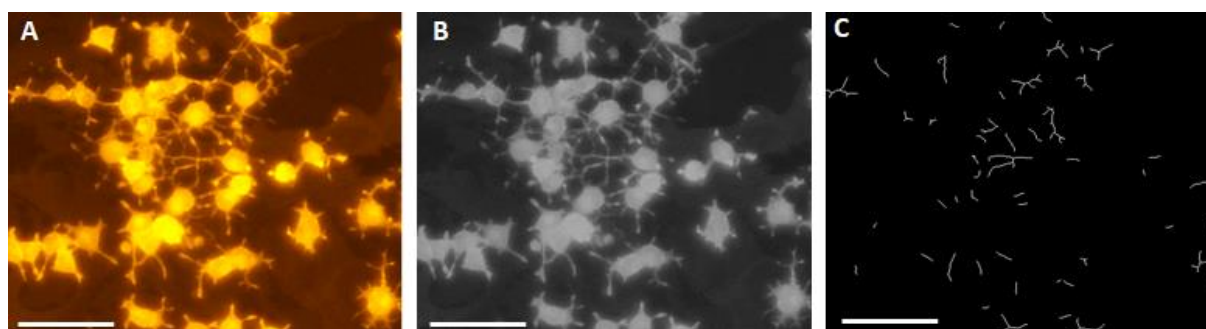


Figure 25 : Mesure de l'effet des vésicules (culot-UC) sur l'induction de la croissance neuritique dans la lignée cellulaire PC-12. A. Photos de microscopie à fluorescence des cellules PC-12 marquées à la phalloïdine. B. traitement des images dans le logiciel NeuriteTracer ImagJ de manière à les avoir au même niveau de gris. C. Elimination du signal des corps cellulaires et production des traçages correspondants aux neurites. La barre d'échelle correspond à 20 μm .

Sur la lignée SH-SY5Y, les vésicules isolées par gradient de densité en OptiprepTM ont été préalablement quantifiées et ajoutées à des taux de 10^4 à 10^9 particules par puits afin d'évaluer les effets dose/réponse et de déterminer la concentration optimale pour induire un effet sur la croissance neuritique. Les conditions de changement de milieu et de culture étaient similaires à celles utilisées pour la lignée PC-12 tout comme l'arrêt de la culture et le marquage cellulaire. Par contre, pour les besoins d'acquisition en microscopie à fluorescence, le fond en plastique des boîtes 24 puits n'était pas adapté, c'est pour cela que les mêmes conditions expérimentales ont été appliquées mais sur un fond en verre avec l'utilisation des FluoroDish (World Precision Instrument, Satasota Chine).

RESULTATS

L'objectif de la thèse est axé sur plusieurs aspects autour des vésicules extracellulaires (VEs) et de leur potentielle implication dans le dialogue entre les cellules microgliales et les neurones. A cet effet, le modèle d'étude choisi est la sangsue médicinale (*Hirudo medicinalis*). Elle présente des capacités de régénération de sa chaîne nerveuse (CN), révélées par des études aussi bien *in vivo* qu'*ex vivo*. Des cultures organotypiques de la CN peuvent être réalisées. Après dissociation de la CN, les neurones et les cellules microgliales peuvent être mis en culture dans des conditions peu contraignantes. Comme tout modèle, la sangsue présente également quelques désavantages. Par exemple, la caractérisation complète du génome n'a pas encore été menée. Il manque donc des données protéiques et génétiques, conséquences directes des bases de données qui peinent à s'enrichir du fait d'un nombre de groupes travaillant sur la sangsue trop faible. Entreprendre un projet de recherche signifie une construction et une optimisation des outils à utiliser, leurs validations et ensuite la valorisation des résultats obtenus.

La microglie est isolée à partir de la CN de sangsue : après la dissociation mécanique du tissu nerveux, les neurones et la microglie sont séparés par filtration, remis en suspension dans du milieu L15 complet et mis en culture (Figure 24a). Dans cette étude, les cellules microgliales représentent la source de vésicules extracellulaires et les neurones les cellules réceptrices de ces VEs.

Les milieux conditionnés issus des cultures primaires de cellules microgliales sont fractionnés par centrifugations et ultracentrifugations différentielles (figure 24b). Le culot obtenu après l'étape d'ultracentrifugation, désormais nommé culot-UC, est analysé soit directement pour son contenu protéomique, soit chargé sur un gradient de densité Optiprep™ discontinu (5%, 10%, 20% et 40%) (figure 24b). Huit échantillons sont recueillis à partir du haut du gradient et sont nommées fractions-ODG, numérotées dans l'ordre de récupération F1 à F8 (figure 24c).

Dans les échantillons UC et ODG, le nombre de particules est évalué à l'aide de la technologie NTA (*Nanoparticles Tracking Analysis*). La morphologie des VEs est vérifiée par microscopie électronique à transmission (MET). Le contenu protéomique des VEs est étudié par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Enfin, l'effet des VEs sur les neurones de sangsue et des lignées neuronales mammifères est suivi *in vitro* en comparant la longueur des neurites par rapport à une condition contrôle en absence de VEs microgliales.

Dans les premières expériences réalisées, les cellules microgliales sont stimulées ou non par de l'ATP. Par la suite seule la condition sans stimulation exogène a été retenue.

1.1 La filtration permet de séparer les cellules microgliales des neurones

Les chaînes nerveuses ont été disséquées et les cellules dissociées dans un milieu L15 complet en présence de SVF déplété en exosomes. La microglie et les neurones sont séparés sur la base de leurs tailles respectives. Les cellules microgliales ont une taille $\leq 5 \mu\text{m}$ alors que celles des neurones varie entre 6 et 70 μm . La figure 26 (panel de gauche) représente une image de microscopie confocale d'une co-culture neurones-cellules microgliales avec le Hoechst comme marqueur nucléaire et Iba1 comme marqueur des cellules microgliales. Le résultat témoigne de cette différence de taille. Le noyau de la cellule microgliale se situe autour de 3 μm alors que le noyau neuronal (flèche jaune) autour de 15 μm . Une coloration au Hoechst a permis de valider la qualité de l'isolement, en effet la photo de droite de la figure 26 montre un marquage blanc ponctiforme correspondant aux noyaux de cellules microgliales en culture primaire, observées à l'objectif 20X en microscopie photonique. On y voit des noyaux dont la taille est homogène, les résultats suggèrent fortement que le diamètre des pores des filtres sont assez résolutifs pour permettre une purification microgliale optimale sans contamination neuronale.

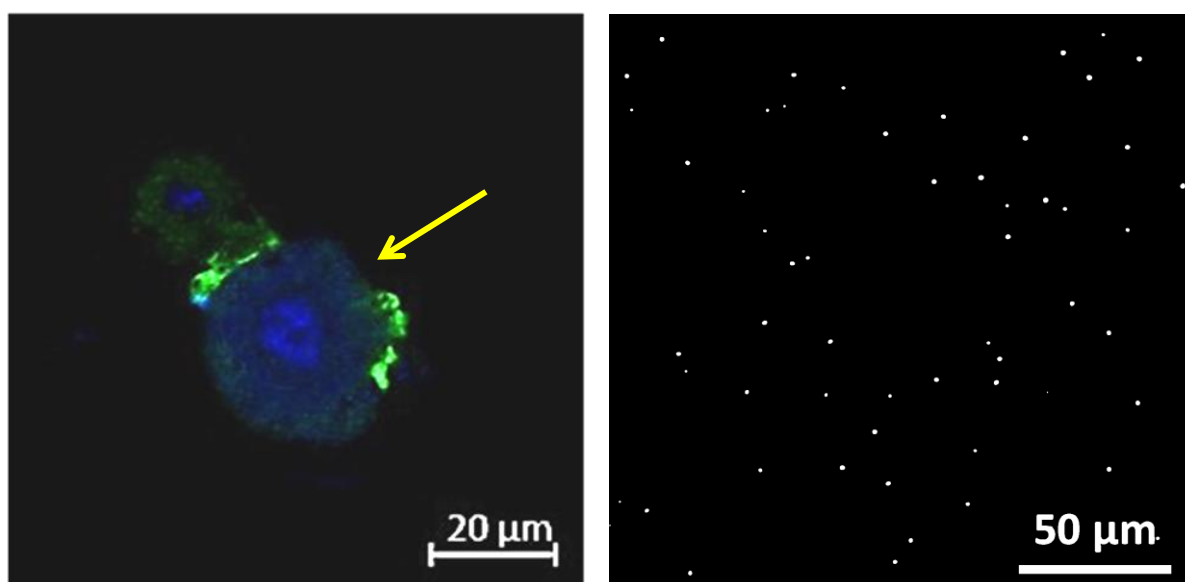


Figure 26 : Coloration au Hoechst des noyaux cellulaires. Gauche. Observation en microscopie confocale (x40) d'une co-culture neurones- cellules microgliales montrant la différence de taille entre neurone (flèche jaune) et cellules microgliales immuno-détectées avec un anticorps anti Iba-1 (vert). Marquage des noyaux au Hoechst (bleu) et **Droite.** Les cellules microgliales dont le noyau est marqué au Hoechst (blanc) apparaissent sous forme de points. Observation au microscope optique (x20).

1.2 Activation ATP dépendante

1.2.1 L'ATP n'induit pas de changements dans la taille mais dans la quantité des VEs secrétées par les cellules microgliales

L'ATP est considérée comme un activateur général de microglie. Sa libération par les cellules nerveuses chez la sangsue est régulée *via* le canal innexine/pannexine [24]. C'est dans ce contexte que l'ATP a été utilisé pour mimer le message envoyé par les neurones lésés. Les cellules microgliales en culture ont été activées par des concentrations croissantes en ATP pendant 1h. Les VEs ont été purifiées du milieu de culture à l'issue de la stimulation par ultracentrifugation. La quantification et l'estimation de leur taille ont pu être menées par la technologie NTA. Les culots-UC ont été repris dans du PBS et dilués afin d'être analysés. Les résultats obtenus sont rapportés à la concentration initiale et représentés dans la figure 27. Le graphique " A " représente les variations de la taille moyenne des VEs en fonction de la concentration croissante utilisée en ATP. Il semblerait que l'ATP n'induit pas de différences accrues en termes de taille moyenne des particules. En effet, l'intervalle de taille se situe entre 80 et 100 nm, ce qui correspond aux tailles de vésicules isolées à 100000 g. S'il n'agit pas sur leur taille, l'ATP induit des changements dans la quantité de vésicules secrétées avec un pic de 525×10^8 particules/mL secrétées avec 1 mM d'ATP utilisé (figure 27.B). Les valeurs les plus basses correspondent à $60,5 \times 10^8$ particules/mL et 179×10^8 particules/mL avec respectivement des doses de 0.1 mM et 2 mM d'ATP utilisées.

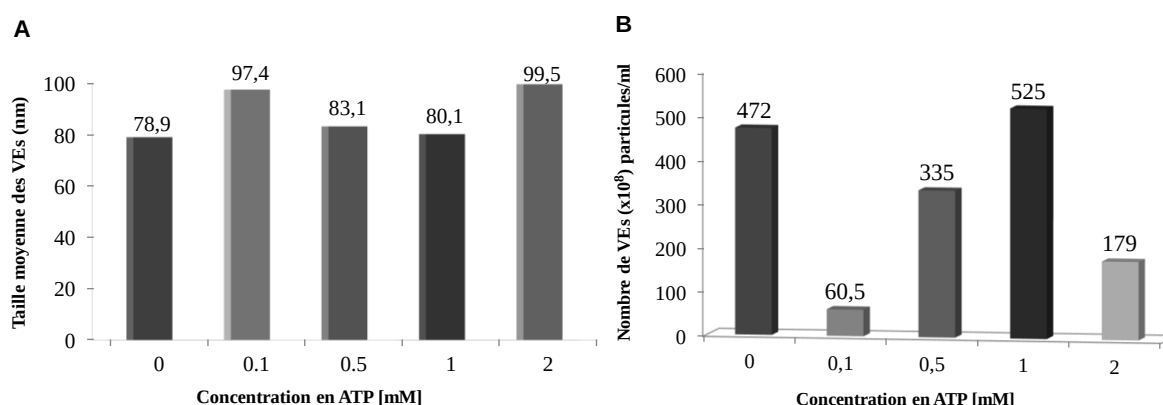


Figure 27 : Impact de l'activation ATP dépendante. Les résultats ont été obtenus par des mesures au Nanosight NS300 suivant la technologie NTA (Nanoparticles Tracking Analysis). **A.** Variation de la taille moyenne des VEs en fonction de la concentration utilisée en ATP. **B.** Variation du nombre de particules ($\times 10^8$) en fonction de la concentration en ATP utilisée.

1.2.2 Effet sur le contenu protéique des vésicules extracellulaires issues de cellules microgliales activées à l'ATP

Suite aux résultats NTA, les vésicules issues des cellules microgliales activées par 1 mM d'ATP et celles issues de cellules n'ayant pas été activées ont été analysées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution afin de montrer l'impact d'une telle activation sur le cargo protéique. Faute d'avoir une banque de donnée annotée, l'ensemble des données protéomiques a été assignée manuellement et comparé dans les logiciels de protéomique dédiés, notamment le logiciel Perseus qui permet une quantification en *label free*. L'analyse n'a pas donné un résultat significativement quantifiable entre les deux conditions et la carte des protéines surexprimées et sous-exprimées dans chaque condition n'a pas pu être générée.

1.3 Analyse des vésicules extracellulaires activées uniquement sous l'effet de la dissection (lésion)

La stimulation des cellules microgliales avec l'ATP nécessitant de nombreuses mises au point expérimentales comme le choix de durée de la stimulation ou de la concentration correcte et physiologiquement adaptée. Le grand nombre d'animaux nécessaires à la réalisation des expériences et la durée des analyses par spectrométrie de masse, nous ont conduit à ne pas poursuivre cette approche. Pour rester dans le cœur du sujet de thèse à savoir l'effet des vésicules extracellulaires d'origine microgliales et leur effet dans un contexte de réparation post lésion, nous nous sommes concentrés sur des VEs isolées à partir de cellules microgliales post dissection et sans stimulation exogène supplémentaire par l'ATP. Nous avons comparé deux techniques d'isolement, l'une suivant une ultracentrifugation différentielle et l'autre avec une étape de centrifugation supplémentaire en gradient de densité Optiprep™. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicatas. En effet, pour chaque réplica biologique, 20 chaînes nerveuses de sangsue ont été disséquées. Les cellules ont été filtrées et mise en culture comme décrit précédemment. Les VEs issues du culot-UC ou ODG ont été analysées au Nanosight NS300 avec la technologie NTA pour les dénombrer. Leur morphologie a été contrôlée en microscopie électronique à transmission (MET). Leur contenu protéique a été analysé en spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

1.3.1 Une étape supplémentaire en gradient induit une diminution du rendement en nombre de particules quantifiées

Le PBS a été utilisé comme contrôle pour les échantillons UC. Pour les échantillons ODG, les contrôles ont été réalisés en déposant du PBS, au lieu du culot VEs, au bas du gradient discontinu d'Optiprep™. Les résultats ont montré $7,21 \times 10^{10} \pm 2,44 \times 10^{10}$ particules / mL dans les échantillons UC (figure 28A), les contrôles PBS ont révélé une quantité négligeable de particules ($0,05 \times 10^8$ particules / mL).

Dans les fractions ODG (figure 28B), une quantité importante de particules ($11,2 \times 10^8 \pm 10,65 \times 10^8$ particules / mL) a été observée dans F1. Des quantités inférieures, $3,56 \times 10^8 \pm 2,97 \times 10^8$ particules / mL et $5,56 \times 10^8 \pm 3,23 \times 10^8$ particules / mL, ont été détectées dans les fractions F2 et F3, respectivement. La quantité de particules a augmenté dans les fractions F4 et F5 avec respectivement $7,16 \times 10^8 \pm 1,38 \times 10^8$ et $10,96 \times 10^8 \pm 4,96 \times 10^8$ particules / mL. La quantité la plus élevée ayant été observée dans F6 ($19 \times 10^8 \pm 8,9 \times 10^8$ particules / mL). Enfin, un niveau comparable à F4 et F5 a été détecté dans F7 ($8,86 \times 10^8 \pm 4,7 \times 10^8$ particules / mL) et dans F8 ($7,63 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$ particules / mL). La quantité de particules détectées dans les échantillons UC était supérieure à celle mesurée pour les fractions ODG isolées.

Dans toutes les fractions de contrôle ODG, le nombre de particules est resté très faible par rapport aux échantillons correspondants. Ensemble, ces données confirment que les particules détectées par NTA ne proviennent pas des solutions utilisées lors du processus d'isolement (PBS et Optiprep™) mais bel et bien du milieu conditionné.

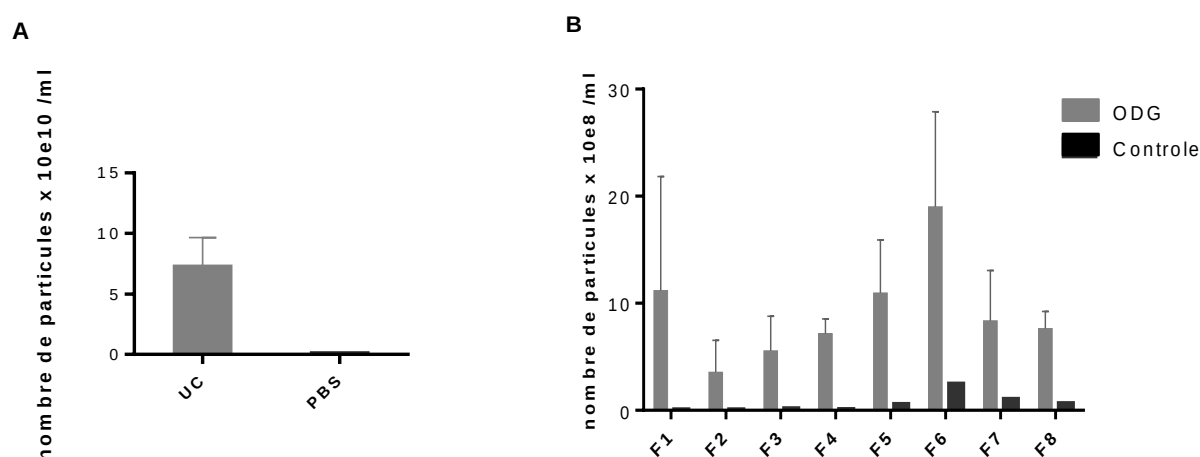


Figure 28 : Analyse des particules avec la technologie NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) sur les vésicules extracellulaires microgliales. (A) Les particules des échantillons UC ont été quantifiées. Le PBS a été utilisé comme contrôle négatif. (B) Le comptage des particules dans toutes les fractions ODG (F1 à F8) a été comparé à des fractions de gradient Optiprep™ sans vésicules et traitées de la même manière (contrôle). Les barres d'erreur indiquent l'écart type relatif aux trois expériences.

1.3.2 Les cellules microgliales de sangsue secrètent des VEs morphologiquement similaires à celles de mammifères

Pour s'assurer que les particules quantifiées par NTA sont bien des vésicules extracellulaires et afin d'évaluer la morphologie des VEs microgliales de sangsue, des analyses par microscopie électronique à transmission (MET) ont été effectuées. Sur des vésicules isolées avec les deux méthodes, UC et ODG, une coloration négative a été effectuée (figure 29). Les VEs isolées par gradient UC ou OptiprepTM ont des diamètres très hétérogènes, allant de 50 nm à 200 nm, certaines atteignant 500 nm. Dans les fractions ODG la présence de vésicules extracellulaires a principalement été détectée dans les fractions F4, F5 et F6. Il est intéressant de noter que les images de MET mettent en évidence des VEs de densités aux électrons différentes dans les échantillons ODG. Certaines vésicules extracellulaires semblent plus denses par rapport à d'autres (flèche). Morphologiquement, les vésicules extracellulaires restent essentiellement sphériques dans les fractions ODG et apparaissent aplaties dans les échantillons dans le culot-UC. Dans ces derniers échantillons, il a été détectée la présence de petites structures sphériques à l'arrière-plan (têtes de flèche). Dans les deux protocoles, les vésicules extracellulaires apparaissaient parfois sous forme d'agrégats, ce qui rend difficile l'appréciation de la morphologie, de la taille et le dénombrement de ces structures (figure 29).

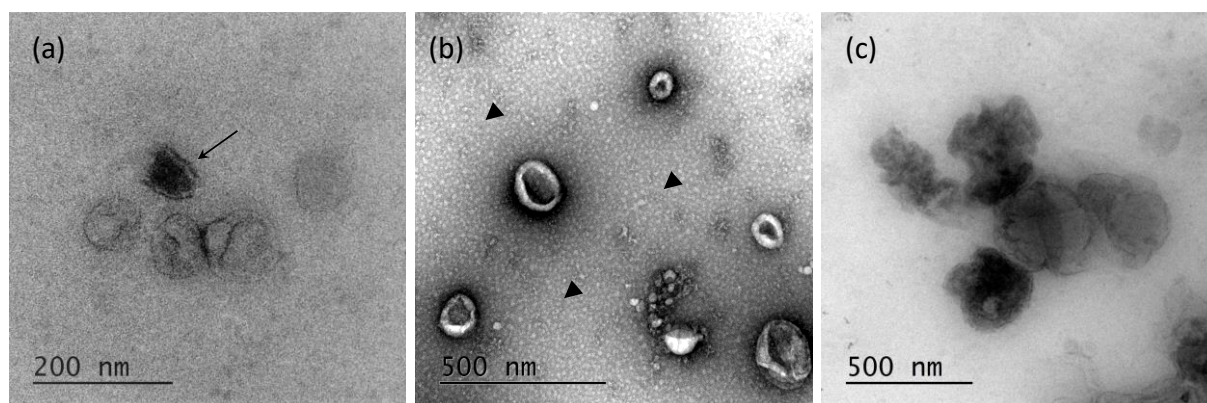


Figure 29 : Microscopie électronique à transmission des vésicules extracellulaires. (a) Morphologie des VEs isolées par gradient de densité OptiprepTM (ODG fraction positive F4, F5, F6). Certaines vésicules sont plus denses aux électrons (flèche). (b) Les VEs purifiées par ultracentrifugation (culot-UC) semblent aplaties. A l'arrière-plan on remarque la présence de structures globulaires qui ressemblent structurellement à des lipoprotéines (têtes de flèche). (c) Des agrégats de vésicules extracellulaires ont été observés indépendamment des protocoles d'isolement utilisés.

1.3.3 Caractérisation protéique par spectrométrie de masse

Les premières études de protéomiques menées sur les vésicules extracellulaires ont soulevé plusieurs questions dont l'assignation manuelle des résultats. En effet, le fait que cette étape ne soit pas automatisée a rendu l'analyse extrêmement chronophage (≈ 15 jours/fichier). Toutes les fractions ODG ont été analysées par spectrométrie de masse. La première étape fut d'annoter les bases de données à notre disposition en interne. Par la suite les données issues des deux protocoles de purification ont été analysées pour la quantité et la qualité des protéines qui y sont contenues. Principalement par l'utilisation du logiciel *MaxQuant*.

1.3.3.1 Annotation des banques de données

En combinant plusieurs outils dont la banque de données Uniprot et le logiciel d'alignement Blast. Les 74888 séquences protéiques de la banque *Hirudo medicinalis* ont pu être annotées par homologie avec les banques connues. Cette méthode d'annotation entraîne une hétérogénéité d'espèces qui est problématique pour le traitement des résultats dans les logiciels de protéomique notamment pour déterminer les voies de signalisation ou les compartiments cellulaires dans lesquels sont impliquées les protéines identifiées. Aussi, si l'annotation choisie correspond à une autre espèce qu'*Homo sapiens*, un orthologue humain est systématiquement recherché et réattribué à la protéine de départ. Cela a permis une ré annotation finale mono-espèce. Cette banque est dédiée à une utilisation exclusivement en interne.

1.3.3.2 L'isolement des VEs avec une ultracentrifugation supplémentaire en gradient Optiprep™ permet une amélioration du nombre de protéines identifiées

Les culots UC ainsi que ceux des fractions ODG isolées ont été chargés sur gel SDS-PAGE. Après migration et digestion des protéines par la trypsine, les peptides récupérés ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse. Les résultats de l'analyse des données brutes par le logiciel MaxQuant sur des échantillons UC a permis d'identifier 354 protéines (tableau 9 en annexe). La même approche réalisée sur les fractions ODG a montré une augmentation importante du nombre total de 776 protéines identifiées (tableau 1 à 8 en annexe). 242 protéines étant communes aux fractions ODG et les culots-UC (figure 30 A).

Il est intéressant de noter que la majorité des protéines identifiées sont retrouvées dans les fractions qu'on appellera fractions ODG-positives et qui sont les fractions F4, F5 et F6 avec 479, 401 et 530 protéines respectivement. Ces résultats prennent en compte les trois répliques biologiques (figure 30 B). 329 protéines sont communes à ces trois échantillons alors que 38,

54 et 16 protéines se chevauchent entre les fractions F4-F5, F4-F6 et F5-F6, respectivement. De plus, 58 protéines sont spécifiques de la fraction F4, 18 de la fraction F5 et 131 de la fraction F6. Comme on peut s'y attendre, la quantité élevée de protéines dans ces fractions est corrélée avec l'accumulation de vésicules à ces densités là du gradient d'iodixanol (1.12-1.22 g/ mL).

Un nombre total de 513 protéines ont été identifiées dans les fractions qu'on appellera ODG-fractions négatives et qui sont les fractions F1, F2, F3, F7 et F8. Parmi celles-ci, 49, 65, 102 protéines ont été identifiées dans F1, F2 et F8, respectivement (figure 30 C). Ces protéines correspondent principalement à plusieurs composants cellulaires, notamment du noyau, du cytosol et du cytoplasme (membres de la famille des histones, apolipoprotéines, caspases, actine, tubuline et membres de la famille de la protéine kinase II dépendante du calcium / calmoduline) (tableaux supplémentaires 1, 2 et 8). Un nombre plus élevé de protéines a été trouvé dans F3 et F7, avec 117 et 183 protéines identifiées respectivement (tableaux supplémentaires 3 et 7). Les résultats ont montré que 89 protéines se chevauchent entre F3, F4, F6 et F7 (figure 30 D). De plus, 109 protéines sont communes à F3 et F4 et 174 à F6 et F7. Seuls 6 sont exclusives à F3 et 9 à F7. De manière intéressante, 112 protéines sont retrouvées en commun exclusivement entre le culot-UC et ODG-fractions négatives (figure 30 A). Cependant il n'y a pas de protéines communes retrouvées exclusivement dans les clot-UC et les fractions ODG-positives.

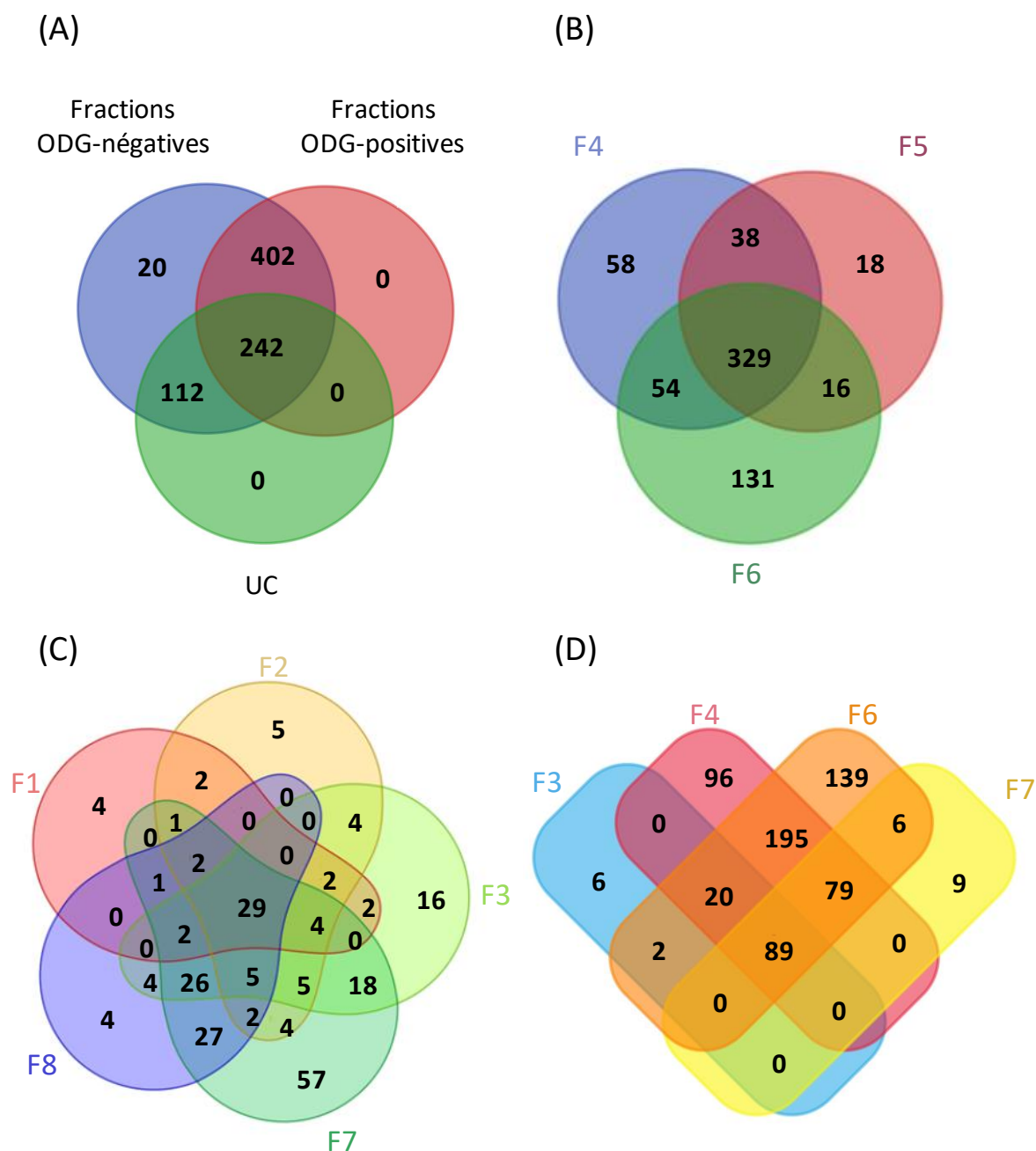


Figure 30 : Diagrammes de Venn indiquant le nombre de protéines identifiées dans les échantillons UC et ODG. (A) Comparaison entre les fractions UC, fractions ODG-positives et fractions ODG-négatives. (B) Nombre de protéines identifiées dans les fractions ODG-positives F4, F5 et F6. (C) Protéines identifiées dans les ODG-fractions négatives F1, F2, F3, F7 et F8. (D) Protéines identifiées à la fois dans les fractions F3, F7, et les fractions ODG-positives F4 et F6.

1.3.3.3 La purification par ODG sépare efficacement les vésicules extracellulaires des contaminants protéiques

L'analyse quantitative sans marquage (*label free quantification*) des données générées dans MaxQuant pour toutes les fractions ODG, sur les trois répliques biologiques (R1, R2, R3) a été effectuée avec le logiciel Perseus. Le résultat est représenté sous forme de *Heat map*. Pour chaque protéine l'intensité relative est mesurée en fonction du test anova appliqué basé sur une $p\text{ value} < 0,05$ dans le logiciel. 301 protéines présentent une différence significative. La figure 31 montre en rouge les protéines surexprimées, en noir celles qui ne varient pas et en vert celles qui sont sous-exprimées pour chaque fraction. Pour un souci de lisibilité, au vu du nombre de protéines, leurs noms n'ont pas été ajoutés sur chaque branche. La cartographie montre que les fractions se regroupent plutôt bien notamment pour R2 (cadran rose) où les fractions F4, F5, F6 sont sur la même racine de même pour F1, F2, F3, F7 et F8. Pour R1 (cadran bleu) F5 et F6 sont proches dans le groupement contrairement à F4 qui est très éloigné et pour R3 (cadran jaune) c'est F6 et F4 qui se regroupent bien et F5 qui est éloigné dans la branche. Les fractions dans les extrémités du gradient F2, F3 et F8 sont regroupées ensemble pour R1 et R3. Ces résultats montrent qu'il subsiste une distinction dans le cargo protéique entre les fractions positives où sont retrouvées les vésicules et les fractions où elles n'y seraient pas. De manière non exhaustive, on retrouve dans les protéines surexprimées (en rouge) dans les fractions ODG positive les tétraspanines 1 et 7, les protéines de trafic membranaire à l'exemple des RAS GTPase dont RAB 6 et des annexines, des protéines du cytosquelette comme l'actine, la gelsoline ou encore la cofiline, des moteurs moléculaire comme la dynéine et des protéines impliquées dans la prolifération et l'adhésion cellulaire comme la desmoglérine et des protéines utilisées comme marqueurs vésiculaire comme HSP70 et la famille des protéines 14-3-3. A l'opposé, des protéines sous exprimées (en vert) dans les fractions ODG positives ont des signatures majoritairement mitochondriales (cytochrome c, citrate lyase beta-like protéine, aldéhyde déshydrogénase).

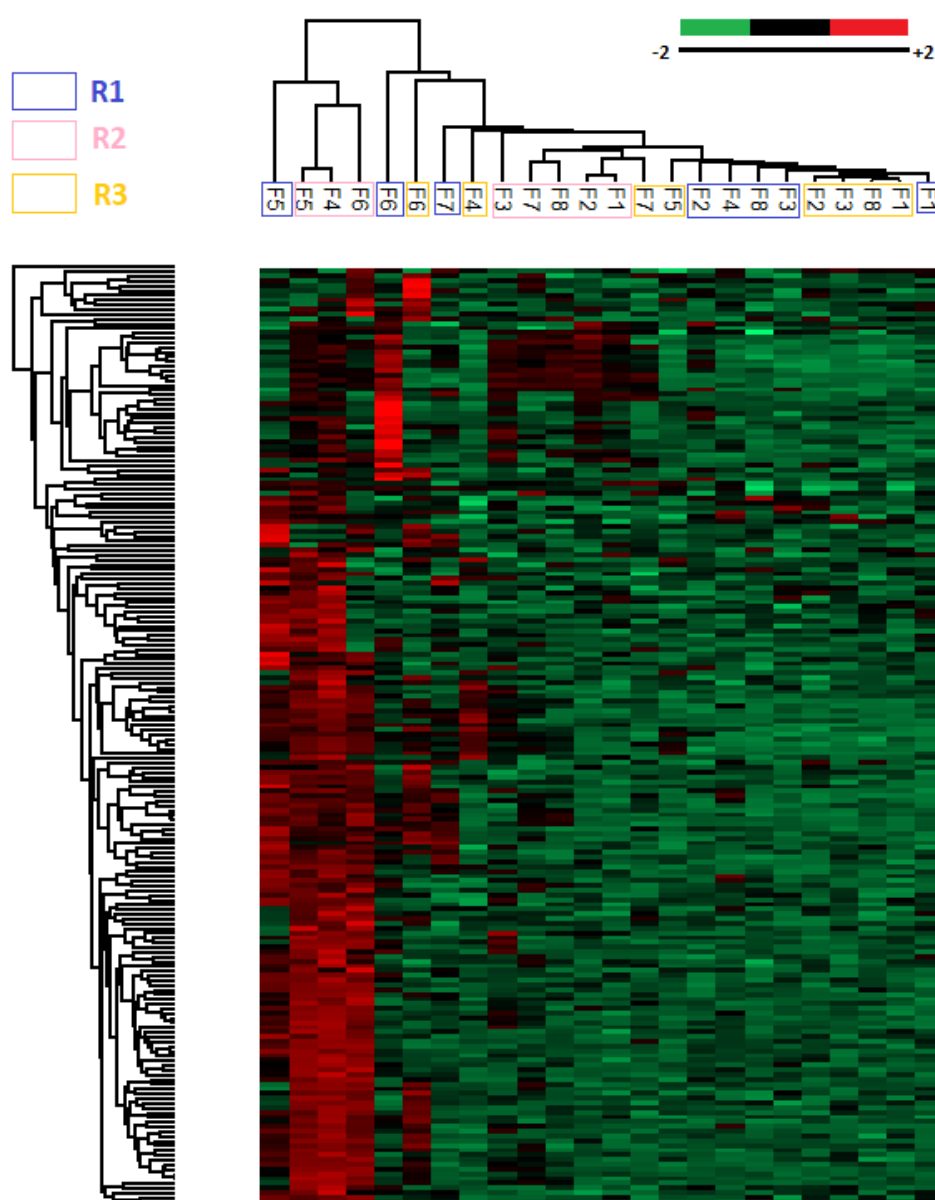


Figure 31 : Cartographie des protéines quantifiées sans marquage et regroupées pour les trois réplicas (R1, R2, R3) des fractions ODG, représentée sous forme d'un *Heat map*. Les cadrans bleu, rose et jaune représentent les réplicas R1, R2 et R3 respectivement. En rouge les protéines surexprimées, en noir celles qui ne varient pas et en vert celles qui sont sous exprimées pour chaque fraction. Les branches du haut représentent le groupe où chaque fraction a été classée. Les branches sur le côté représentent les protéines dont l'intensité varie. Pour un souci de lisibilité, vu le nombre de protéines, leurs noms n'ont pas été ajoutés pour chaque branche.

Résultats

Des analyses supplémentaires ont été effectuées aussi bien pour le culot-UC que pour les fractions ODG-positives (F4, F5 et F6) à l'aide du logiciel DAVID Proteomic. Des investigations ont été réalisées sur l'ontologie des gènes (GO term) ainsi que sur la localisation cellulaire des protéines identifiées. Les pourcentages de couverture pour chaque terme lié aux vésicules extracellulaires (Figure 32) et la *p value* à laquelle il est détecté sont supérieures dans les fractions ODG-positives par rapport au culot-UC (tableaux supplémentaires 10 et 11). Par exemple, pour le terme « exosomes extracellulaires », 57,1% des gènes enregistrés sont classés comme faisant partie de cette composante pour les échantillons UC, contre 62,4% des gènes pour les fractions ODG EVs-positives. De plus, la *p value* pour ce terme est de $3,8e-53$ pour les échantillons UC, alors que celle-ci, atteint une valeur de $4,9e-158$ pour ODG. D'autre part, les signatures associées à des contaminants appartenant aux mitochondries, à l'appareil de Golgi (AG) et à la lumière du réticulum endoplasmique (LRE) sont principalement observées dans le culot-UC.

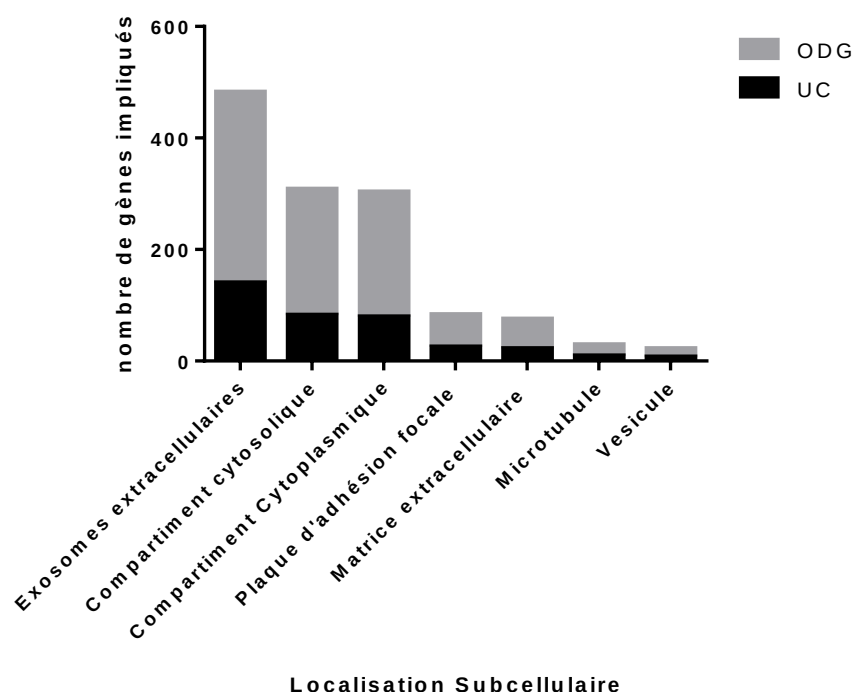


Figure 32 : Analyse de la localisation subcellulaire des protéine identifiées dans les vésicules extracellulaires. Les protéines identifiées dans les échantillons UC ainsi que les fractions ODG-positives (F4, F5, F6) ont été analysées pour leur localisation subcellulaire en fonction du nombre de gènes impliqués qui permettent la classification.

1.3.3.4 Les vésicules extracellulaires de sangsue ont des signatures similaires à celles identifiées chez les mammifères

Les protéines identifiées dans les vésicules extracellulaires de sangsue sont comparées qualitativement dans les fractions ODG et UC aux 100 protéines les plus communément décrites dans la banque de données ExoCarta (Top 100) [58]. Parmi les protéines des échantillons UC, 29 font parties de cette liste Top 100 (Tableau 4) : cependant, aucune n'est exclusive à l'échantillon UC, mais toutes sont détectées dans l'une des fractions ODG positives F4, F5 ou F6. En tenant compte de toutes les protéines des fractions ODG, 64 sont identifiées dans la liste Top 100, dont 62 sont détectées au moins une fois parmi les protéines des fractions F4, F5 ou F6. De plus, 13 sont présentes simultanément dans les fractions F4, F5 et F6 (par exemple, la flotilline 1, la filamine A et la protéine 14-3-3 epsilon), 9 sont détectées en même temps dans deux de ces fractions (par exemple la protéine 14-3-3 zêta / delta, la moésine et la protéine RAB-7a). De manière intéressante, 5 protéines typiques sont trouvées exclusivement dans F6 (par exemple, la protéine HSP70, la chaîne de la myosine 9, la tubuline alpha-1C, l'ezzrin, la protéine 14-3-3 gamma). L' α -2-macroglobuline et la sous-unité epsilon du complexe T protéique de la protéine A sont les seules du top 100 uniquement détectées dans les fractions F1 et F7, respectivement. Enfin, 9 protéines de la liste top 100 sont identifiées dans toutes les fractions ODG (par exemple, l'Actine, la GAPDH, l'HSPA8 et l'Annexine A2). Ces résultats suggèrent fortement qu'une étape supplémentaire utilisant une ultracentrifugation ODG augmente significativement le rendement en protéines liées aux EVs, présentes principalement dans les fractions 4, 5 et 6.

Résultats

Tableau 4. Comparaison entre les protéines ExoCarta et les protéines identifiées dans le culot-UC et les fractions ODG.

Nom de gène	Nom de protéine (en anglais)	Culot UC	Fractions ODG							
			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
CD9	CD9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	-	+	+	+	+	+	+	+	+
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ANXA2	Annexin A2	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD63	CD63 antigen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SDCBP	Syntenin-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENO1	Alpha-enolase	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	+	+	+	-	+	+	+	+	-
TSG101	Tumor susceptibility gene 101 protein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PKM	Pyruvate kinase PKM	+	-	+	+	+	+	+	+	-
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain, LDH-A	+	-	-	-	+	+	+	-	-
EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	-	+	+	+	+	+	+	+	+
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	-	-	-	-	+	-	+	-	-
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	-	-	-	-	+	+	-	-	-
EEF2	Elongation factor 2	-	-	+	+	+	+	+	+	-
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	+	-	+	+	+	+	+	+	+
HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	+	-	+	+	+	+	+	+	-
ANXA5	Annexin A5	+	-	+	+	+	+	+	+	+
FASN	Fatty acid synthase	-	-	-	-	-	-	+	-	-
YWHAE	14-3-3 protein epsilon	+	-	-	-	+	+	+	-	-
CLTC	Clathrin heavy chain 1	+	-	-	-	+	+	+	+	-
CD81	CD81 antigen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALB	Serum albumin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	+	-	-	-	+	+	+	-	-
TPI1	Triosephosphate isomerase	+	-	-	-	+	+	+	+	-
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	+	-	-	+	+	+	+	-	-
MSN	Moesin	+	-	-	-	+	+	-	-	-
CFL1	Cofilin-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRDX1	Peroxiredoxin-1	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PFN1	Profilin-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAP1B	Ras-related protein Rap-1b	+	-	-	+	+	+	+	+	-
ITGB1	Integrin beta-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain, 4F2hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HIST1H4A	Histone H4	-	+	+	+	+	+	+	+	+
GNB2	Guanine nucleotide-binding protein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATP1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Résultats

Suite du tableau 4										
YWHAQ	14-3-3 protein theta	+	-	+	+	+	+	+	+	-
FLOT1	Flotillin-1	+	-	-	-	+	+	+	-	-
FLNA	Filamin-A	+	-	-	-	+	+	+	-	-
CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	-	-	-	-	+	+	-	-	-
CDC42	CDC42 small effector protein 1	+	-	-	-	+	+	+	-	-
YWHAG	14-3-3 protein gamma	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A2M	Alpha-2-macroglobulin, Alpha-2-M	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANXA1	Annexin A1	-	-	-	+	-	-	+	-	-
RHOA	Transforming protein RhoA	-	-	-	-	+	+	+	-	-
MFGE8	Lactadherin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRDX2	Peroxiredoxin-2	+	-	-	-	+	+	+	+	-
GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	-	-	-	+	+	+	+	+	-
EHD4	EH domain-containing protein 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACTN4	Alpha-actinin-4	-	-	-	-	+	-	+	-	-
YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	-	-	-	-	-	-	+	-	-
RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	+	-	-	-	+	-	+	-	-
LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	-	-	-	-	+	+	-	-	-
RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARF1	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANXA6	Annexin A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANXA11	Annexin A11	+	-	-	+	+	+	+	+	-
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	-	+	+	+	+	+	+	+	+
KPNB1	Importin subunit beta-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EZR	Ezrin	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ANXA4	Annexin A4	+	-	-	-	+	+	+	-	-
ACLY	ATP-citrate synthase	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TFRC	Transferrin receptor protein 1	-	-	-	-	+	+	+	-	-
RAB14	Ras-related protein Rab-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HIST2H4A	Histone H4	-	+	+	+	+	+	+	+	+
GNB1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
THBS1	Thrombospondin-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAB5A	Ras-related protein Rab-5A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTGFRN	Prostaglandin F2 receptor negative regulator	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Suite du tableau 4										
CCT5	T-complex protein 1 subunit epsilon	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CCT3	T-complex protein 1 subunit gamma	-	-	-	-	+	+	+	-	-
AHCY	Adenosylhomocysteinase	+	-	-	-	+	+	+	-	-
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	-	-	-	-	+	+	+	-	-
RAB5B	Ras-related protein Rab-5B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAB1A	Ras-related protein Rab-1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGA6	Integrin alpha-6	-	-	-	+	+	+	+	-	-
HIST1H4B	Histone H4	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BSG	Basigin	-	-	-	-	-	+	-	-	-
YWHAH	14-3-3 protein eta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	-	-	-	-	-	-	+	+	-
TKT	Transketolase	-	-	-	-	-	+	+	-	-
TCP1	T-complex protein 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STOM	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLC16A1	Monocarboxylate transporter 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAB8A	Ras-related protein Rab-8A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MYH9	Myosin-9	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MVP	Major vault protein	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Total	100	29	12	19	24	50	48	56	29	14
										64

Nous avons également, avec la même base de données ExoCarta, comparé les résultats de protéines identifiées dans les fractions ODG-positives (F4-F5-F6) avec les 55 protéines répertoriées issues de vésicules extracellulaires identifiées dans les cellules microgliales de souris. Les résultats du diagramme de Venn (figure 33) montrent que 15 protéines sont communes, en revanche 40 et 524 protéines sont exclusives des vésicules microgliales ExoCarta et des fractions ODG-positives respectivement. Le détail des listes protéiques est résumé dans le tableau 12 en annexe.

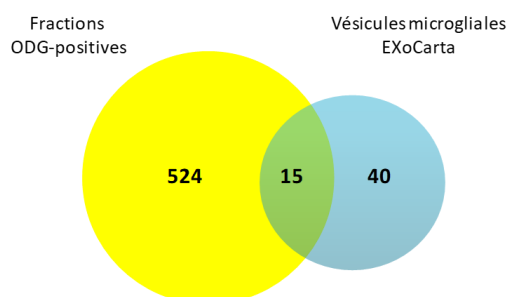


Figure 33 : Comparaison entre les protéines des fractions ODG-positives et celles des vésicules microgliales ExoCarta. 15 protéines communes entre les deux populations, 40 exclusives aux vésicules microgliales ExoCarta et 524 aux fractions ODG-positives retrouvée dans les vésicules microgliales de sangsue.

L'analyse des protéines identifiées dans les fractions ODG-positives (F4, F5, F6) avec le logiciel Funrich a permis d'en savoir plus sur l'interactome de ces vésicules (figure 34).

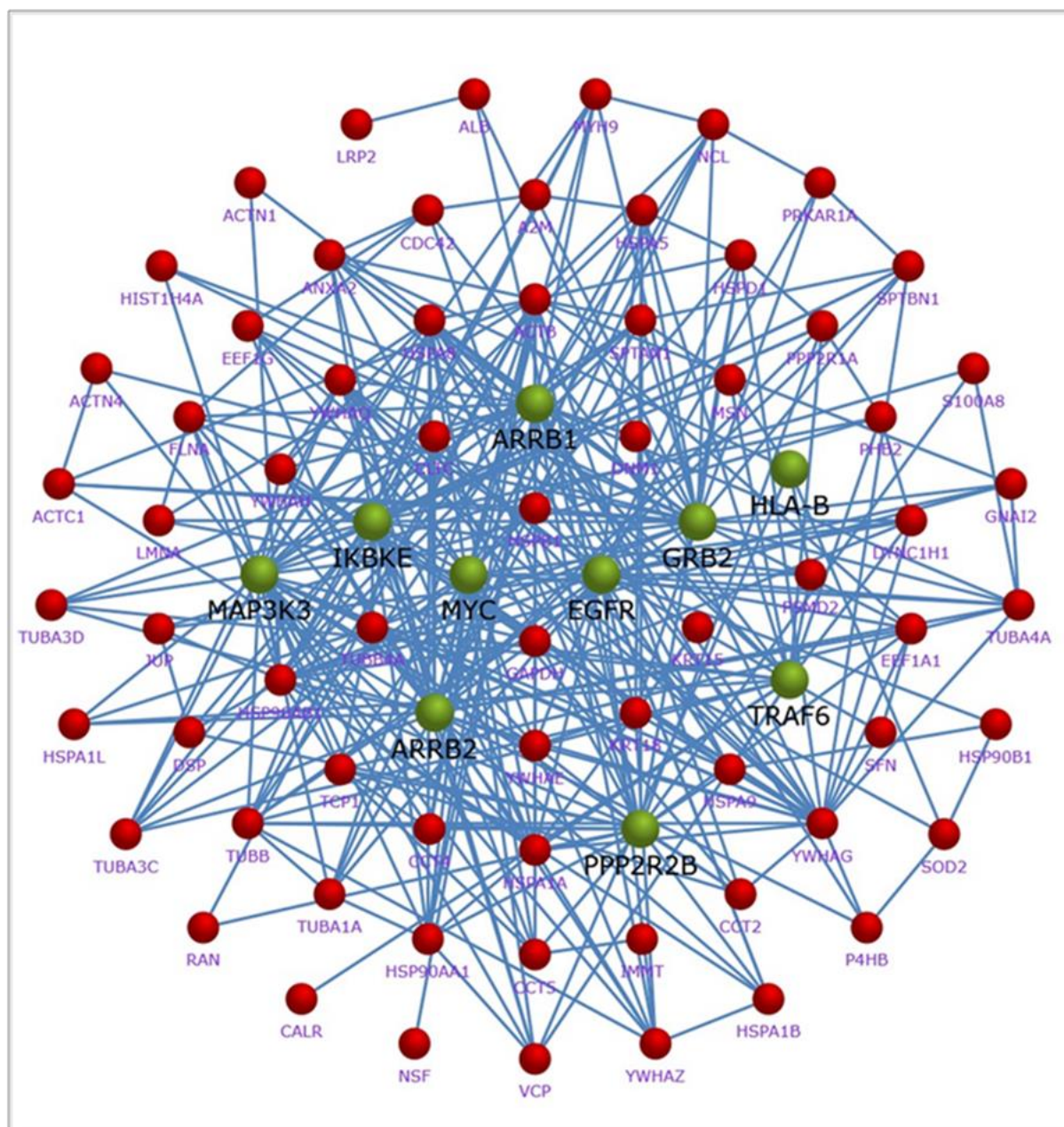


Figure 34 : Vue d'ensemble du réseau d'interactions protéine-protéine des vésicules extracellulaires. Les 69 nœuds qui ont les interactions les plus pertinentes sont représentés. En rouge, les nœuds de la liste de protéines identifiées et en vert les gènes présents dans la base de données du logiciel qui sont susceptibles d'interagir. Les traits bleus représentent les interactions entre les protéines.

Les résultats de cette analyse *in silico* montrent que les protéines identifiées dans les fractions ODG-positives sont notamment impliquées dans les voies de signalisation relatives à la biogenèse des vésicules et portent également des signatures neuronales. De la même façon, des voies de signalisation relatives à la matrice extracellulaire sont retrouvées, notamment passant par l'actine comme protéine clé. Les voies les plus pertinentes dans le contexte de l'étude sont développées ci-dessous par des recherches dans la base de données réactôme. Le tableau de toutes les voies de signalisation potentielles est mis en annexe tableau 13.

- **Biogenèse des vésicules associées à l'appareil de Golgi** (*Golgi Associated Vesicle Biogenesis*). Dans cette voie sont trouvées des protéines sécrétées par la cellule, mais également des enzymes et autres protéines résidentes dans la lumière du réticulum endoplasmique, du Golgi et du lysosome, ainsi que des protéines transportées dans les vésicules. Les protéines synthétisées, emballées ou non et triées finissent par atteindre soit les dernières étapes de la voie de sécrétion ou soit sont dégradées dans les lysosomes.

- **Réseau du facteur de transcription AP-1** (*AP-1 transcription factor network*) comme nous l'avons vu, AP-1 est adaptateur dans les vésicules portant un revêtement de clathrine. La voie de signalisation « réseau du facteur de transcription AP-1 » est un terme collectif désignant un groupe de facteurs de transcription qui se lient aux promoteurs de gènes cibles et en régulent l'expression. La famille AP-1 est constituée d'hétérodimères et d'homodimères de protéines bZIP pour *basic region leucine zipper*, principalement on retrouve des compositions Jun-Jun, Jun-Fos ou Jun-ATF. Les membres de l'AP-1 participent à la régulation d'un certain nombre de processus cellulaires, notamment la croissance, la prolifération, la survie, l'apoptose, la différenciation et la migration cellulaire. Les protéines présentes dans le cargo protéique identifié et qui ont conduit à l'identification de cette voie sont notamment la caténine, connue pour être impliquée dans le transport de vésicules synaptiques et dans les phénomènes d'adhésion cellulaire, ou encore la protéine NRDG1, impliquée dans les réponses aux stress, à la différenciation et la croissance cellulaire.

- **Vésicules dérivées d'un bourgeonnement recouvert de clathrine** (*Clathrin derived vesicle budding*). Il existe au moins deux classes de vésicules recouvertes de clathrine dans les cellules, l'une étant associée à l'appareil de Golgi, impliquée dans le réseau trans-Golgi, et l'autre au niveau de la membrane plasmique. Chaque étape dans la formation de la vésicule contenant le cargo rassemble des protéines de clathrine jusqu'à la formation d'une sphère vésiculaire complète. Avec la scission de la membrane, la vésicule est libérée et finit par perdre sont

revêtement de clathrine lors de son adressage. Dans les protéines identifiées dans le cargo vésiculaire de sangsue et liées à cette voie de signalisation sont retrouvées notamment la chaîne lourde de la clathrine (CLTC) et la protéine de choc thermique HSPA8.

- **Guidage axonal** (*Axon guidance*). Les axones en croissance ont une structure qui leur permet une grande mobilité, ils détectent dans l'environnement les signaux de guidage au moyen de récepteurs et répondent par des modifications cytosquelettiques qui déterminent la direction de leur croissance. Ces signaux extrinsèques ont été divisés en signaux attractifs ou répulsifs qui induisent la croissance ou non des axones. Des études génétiques et biochimiques ont conduit à l'identification de familles hautement conservées de molécules de guidage et de leurs récepteurs guidant les axones. Ceux-ci comprennent les nétrines, les sémaphorines et les éphrines. En outre, de nombreuses autres classes de molécules d'adhésion sont également utilisées pour le guidage des axones, notamment NCAM (*Neural cell adhesion molecule*) et L1CAM (*L1 Cell Adhesion Molecule*). La molécule d'adhésion des cellules neuronales, NCAM, fait partie de la superfamille des immunoglobulines et participe à divers processus cellulaires d'importance pour la formation et le maintien du système nerveux, notamment la différenciation neuronale et la plasticité synaptique qui dépendent des cascades de transduction du signal. Dans la liste des protéines identifiées, les chaînes α et β de la spectrine renvoient à cette voie de signalisation.

Des études *ex vivo* sur des fragments isolés de SNC de sangsue lésé (voir schéma figure 36) ont permis de localiser des vésicules Alix-positives au niveau des lésions (figure 36 A) ainsi que dans les ganglions entre les corps cellulaires neuronaux (figure 36 B). Aucun signal n'est observé en utilisant uniquement l'anticorps secondaire comme contrôle négatif (figure 36 A' et 35 B'), confirmant la spécificité de l'immunodétection. Ces résultats montrent que des vésicules dans la chaîne nerveuse de sangsue sont Alix-positives. Des études antérieures ont montré par l'utilisation d'un marquage Iba1 que les cellules microgliales s'accumulent au niveau de la lésion (figure 36 C). Par ailleurs, immunomarquages en microscopie électronique à transmission sur des cryo-coupes de cellules microgliales avec des anticorps anti-Alix ont été réalisés. La détection par un anticorps secondaire couplé à des particules d'or colloïdal, permet de déterminer que ces structures immunomarquées s'apparentent en taille et en morphologie à des vésicules extracellulaires. Ensemble, ces résultats confirment qu'en partie, les vésicules retrouvées dans le système nerveux central de la sangsue ont une origine microgliale.

Un western blot utilisant l'anticorps anti-Alix sur un extrait total de SNC de sangsue ainsi que sur un extrait vésiculaire UC a été réalisé. Une protéine Alix à la taille attendue de 97 kDa a été mise en évidence dans l'homogénat de SNC et dans les VEs (figure 36 E). La détection d'autres marqueurs vésiculaires en utilisant des anticorps comme l'anti-Tsg101, l'anti-flotilline-1, l'anti-Hsp70 et l'anti-CD9 est restée infructueuse que ce soit par immuno histochimie ou en immunoblot.

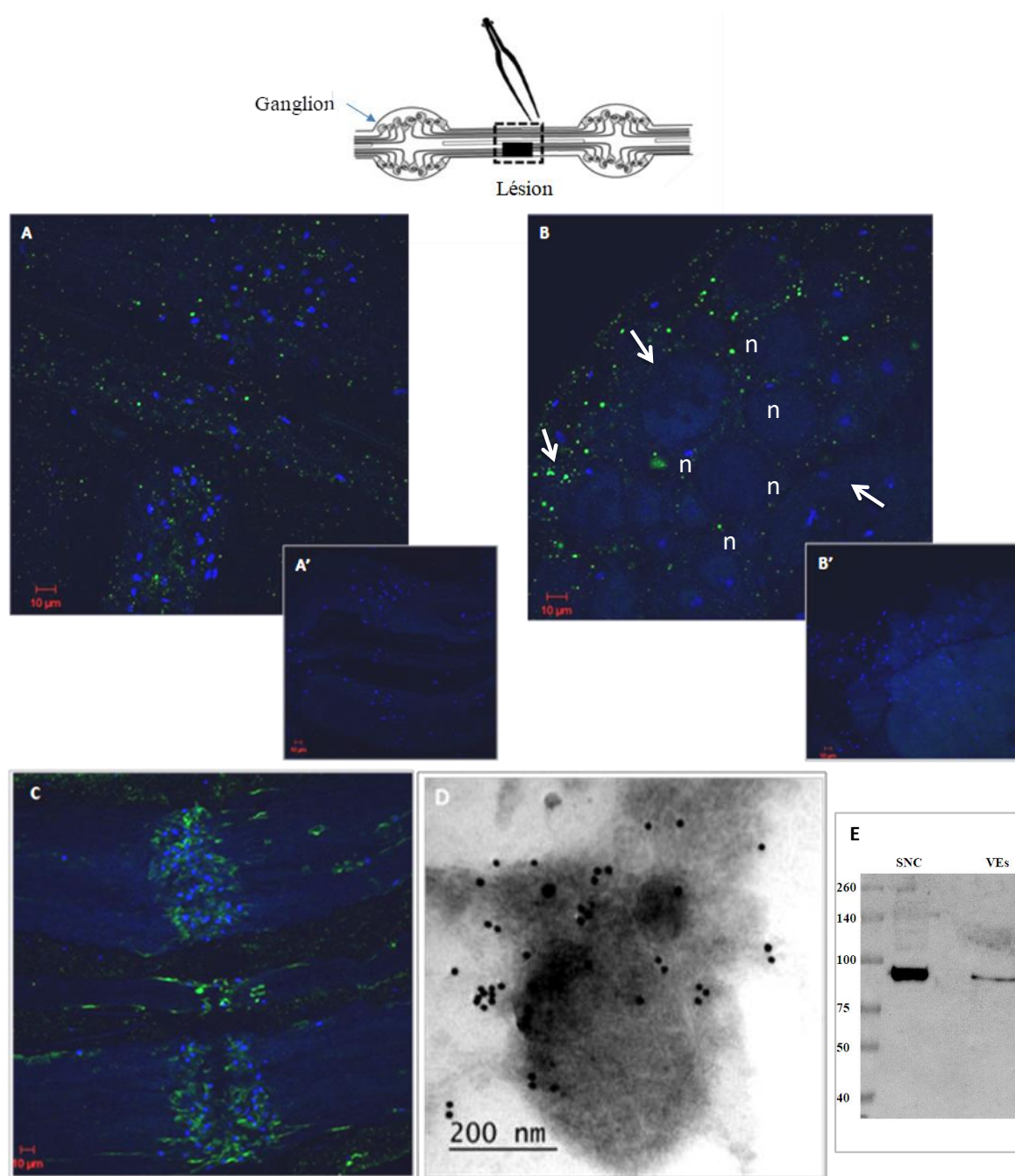


Figure 36 : Immunodetection des vésicules extracellulaires. **A.** Colocalisation des vésicules immunopositives à Alix (vert) et les cellules microgliales avec les noyaux marqués au Hoechst (bleu) au site de lésion **B.** Présence d'un signal Alix positif (vert) autour des corps cellulaires neuronaux (n). Les flèches montrent les cellules microgliales dont les noyaux sont de taille plus petite. **A', B'** Contrôle négatif en utilisant uniquement l'anticorps secondaire. **C.** Accumulation des cellules microgliales immunopositives pour Iba1 (vert) au site de lésion. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) **D.** Observation en microscopie électronique à transmission sur des cryo-coupages de cellules microgliales marquées par des anticorps anti-Alix et révélées par un anticorps secondaire couplé à des particules d'or colloïdal. Un marquage (points noirs) est détecté sur des nanostructures qui s'apparentent en taille et en morphologie à des vésicules extracellulaires. **E.** Détection d'un signal Alix positif en western blot aussi bien dans l'extrait protéique total du système nerveux central de la sangsue que dans l'extrait protéique vésiculaire.

1.4 Les vésicules extracellulaires microgliales de sangsue ont un effet sur l'induction de la croissance neuritique sur les neurones de sangsue

La croissance des neurites est un processus complexe de différenciation neuronale [302]. Afin de déterminer l'apport des vésicules extracellulaires d'origine microgliale dans l'induction de la croissance neuritique *in vitro*, des tests fonctionnels ont été réalisés sur des cultures primaires de neurones de sangsue ainsi que sur des lignées cellulaires de mammifères. Des études préliminaires menées par l'équipe, ont montré que la repousse neuritique des neurones de sangsue *in vitro* est plus importante en présence de cellules microgliales. Un marquage anti-gliarine, marqueur des cellules gliales et non des neurones a permis de mettre en évidence, le long des neurites, des nanostructures immunopositives à la gliarine suggérant leur possible origine microgliale (figure 37 a). Un contrôle de spécificité de l'anticorps secondaire seul dans les mêmes conditions de co-culture a été réalisé. Le résultat montre quelques signaux ponctiformes en arrière plan (figure 37 b) mais rien sur les neurites et le corps cellulaire. Afin de valider l'origine microgliale des nanostructures observées, les neurones en culture seuls (sans présence de cellules microgliales) ont été marqués à la gliarine. Un léger marquage aspécifique est observé dans le corps cellulaire (figure 37 c).

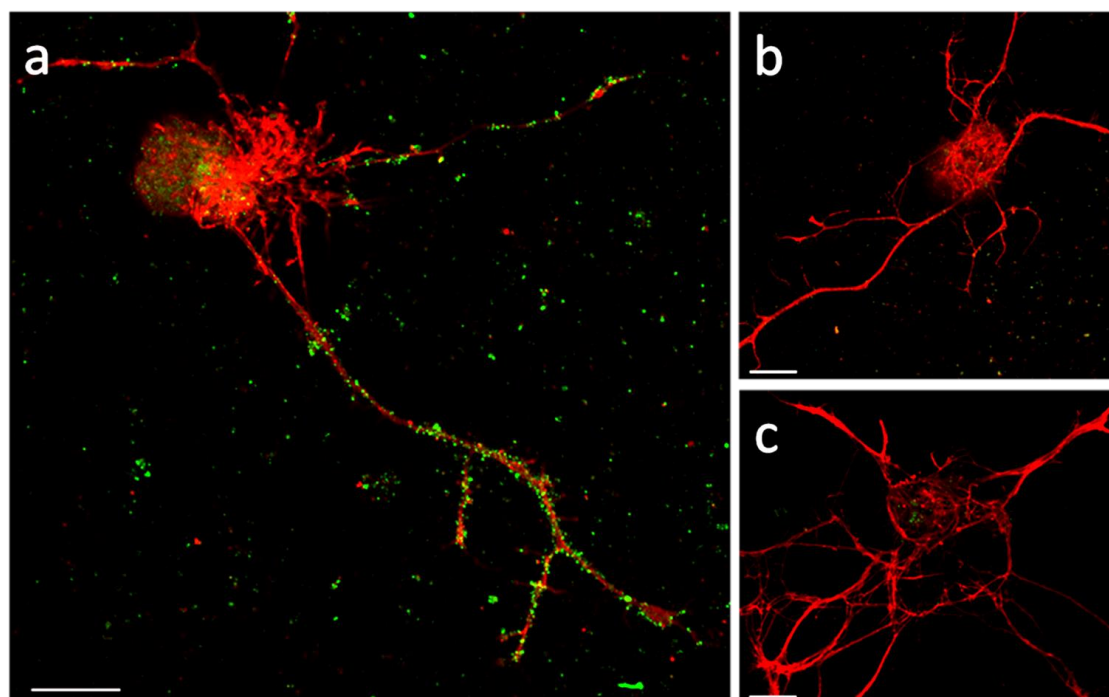


Figure 37 : Apparition de nanostructures en co-culture neurones-cellules microgliales. **a.** Co-culture de cellules microgliales et neurones de sangsue montrant l'agrégation de nanostructures immunopositives à un marqueur des cellules gliales, la gliarine (vert), le long des neurites marqués à la phalloïdine (rouge). Les cellules microgliales ne sont pas visibles car non adhérentes. **b** contrôle négatif : pas de signal spécifique observé dans les mêmes cultures avec l'anticorps secondaire seul. **c** le marquage à la gliarine sur des neurones seuls n'a pas révélé de signal positif. La barre d'échelle correspond à 20 μ m.

1.4.1 Tests fonctionnels sur les cellules du phéochromocytome de la médullosurrénale de rat (PC-12), avec les VEs isolées par ultracentrifugation

Les premiers tests mis en place ont été menés lors des premiers mois de thèse. A ce moment là les VEs étaient isolées par ultracentrifugation et en absence de quantification par NTA. Les tests ont été normalisés non pas par le nombre de VEs ajouté, mais par volume ajouté. Les cellules PC-12 ont été cultivées dans un milieu de différenciation avec des teneurs très faibles en sérum de cheval (0,1%). Dans l'optique de mener des études dose/réponse, les premiers paramètres optimisés étaient les conditions de culture (nombre de cellules par puits et support de culture). Entre la mise en culture, la différenciation et l'arrêt de la culture il s'écoule une durée de 7 jours. Les PC-12 ont été cultivées dans des plaques 24 puits avec une surface de 19 mm². Différentes densités de départ ont été testées (60, 120, 200 cellules/puits) dans un premier temps dans du milieu de multiplication pendant 24h afin de favoriser leur adhésion. Ensuite le milieu a été remplacé par un milieu de différenciation. Les résultats montrent qu'un nombre de 60 cellules/puits est insuffisant pour l'apparition des prolongements neuritiques. Au contraire, avec 200 cellules/puits, la prolifération cellulaire initiale est trop élevée, ce qui induit une densité cellulaire finale trop importante. Ces résultats ont permis de déterminer que pour les PC-12, 120 cellules/puits au départ de la culture semblent être le nombre optimal pour les essais (figure 38). Des tests ont ensuite été effectués pour choisir le support de culture. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de 24 puits en présence ou non d'une lamelle traitée à la poly-D lysine. Les cellules cultivées sur lamelle couverte de poly-D lysine s'arrondissent, montrent un aspect granuleux (flèche blanche, figure 38 D) et finissent par flotter en état de mort cellulaire. De plus, certaines cellules s'infiltrèrent sous la lamelle pendant la culture. N'étant plus dans le plan de focalisation, elles apparaissent alors sous forme de halo lumineux, gênant l'analyse des cellules qui adhèrent sur la lamelle (flèche jaune, figure 38 D). Même si pour l'acquisition d'images en microscopie à fluorescence il est conseillé d'observer des cellules entre lame et lamelle, nous avons choisi au vu de leur mortalité importante, de ne pas opter pour ce support et de cultiver les cellules directement dans les boîtes de culture de 24 puits. Nous avons enfin déterminé la quantité de VEs nécessaire pour observer un effet sur la croissance neuritique en référence au contrôle sans ajout de VEs. Pour cela, deux volumes de vésicules ont été testés 10 et 30 µL.

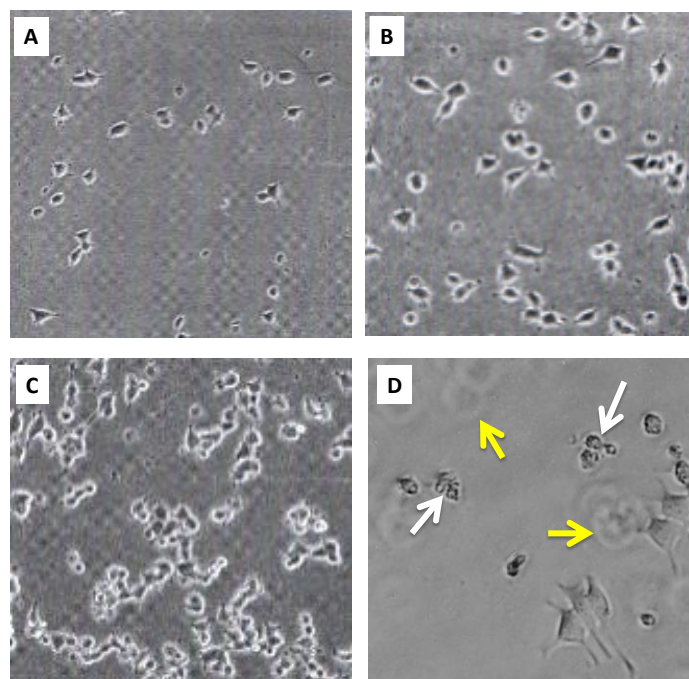


Figure 38 : Test de densité et de support pour la culture cellulaire de PC-12. Des densités de 60 (A), 120 (B) et 200 (C) cellules/puits ont été testées. (D). Avec une lamelle dans le puits portant un revêtement de poly-D lysine, une infiltration de cellules est observée entre la lamelle et le fond de la boîte (flèche jaune) et des cellules en souffrance (flèche blanche).

Les résultats montrent qu'avec des volumes de 10 μ l de VEs, les corps cellulaires conservent leur taille ainsi que leur forme étoilée (figure 39 A). Par contre des volumes de 30 μ l de VEs ont un effet cytotoxique sur les PC-12. Cet effet se manifeste par un changement morphologique des cellules qui s'arrondissent et se rétractent. On remarque également la présence de débris dans le puits et l'aspect granuleux des corps cellulaires (figure 39 B).

Pour estimer la croissance des neurites dans ces conditions, les cellules ont été fixées et marquées à la phalloïdine pour être ensuite observées au microscope à fluorescence. Trois champs ont été choisis aléatoirement dans les conditions contrôles et en présence de 10 μ L de VEs (figure 39 C et D) pour être analysés avec le logiciel NeuriteTracer. La taille moyenne des neurites des cellules PC-12 en présence ou non de vésicules extracellulaires est représentée sous forme d'histogramme (figure 39 E). Les résultats obtenus montrent que les vésicules extracellulaires issues de cellules microgliales de sangsue ont apparemment un effet positif sur l'induction de la croissance neuritique de cellules du phéochromocytome de médullosurrénale de rat. Le détail des analyses statistiques est présenté tableau 14 en annexe.

Résultats

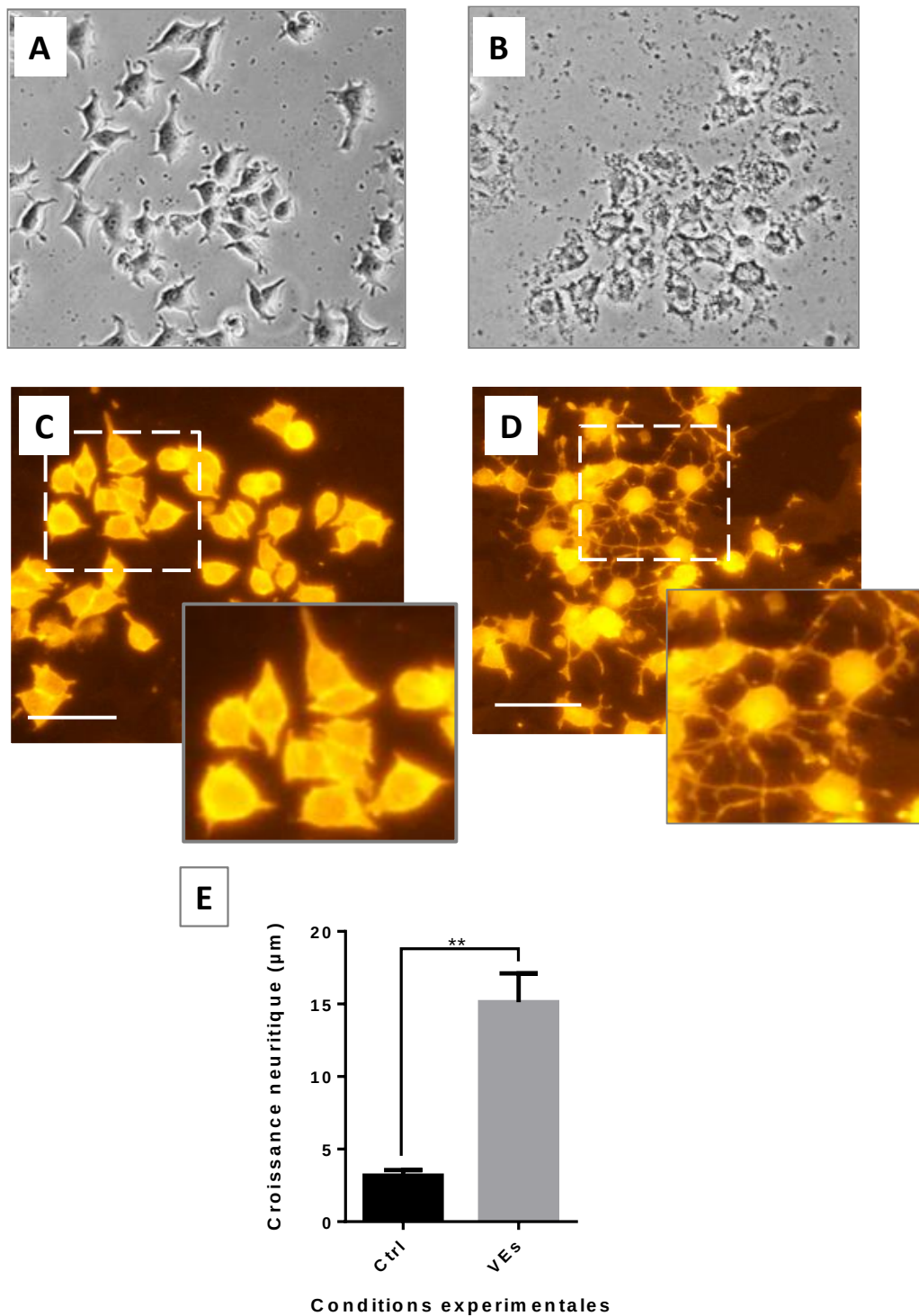


Figure 39 : Mesure de l'effet des VEs microgliales sur les cellules PC-12. (A) et (B) montrent l'état morphologique des PC-12 après rajout de 10 et 30 µL de VEs microgliales de sangsue, respectivement. A 30 µL, la dose semble cytotoxique les cellules changent de morphologie. Les expériences ont été réalisées à nouveau dans les mêmes conditions en comparant (C) la condition contrôle sans VEs à (D) la condition 10 µL de VEs microgliales. (E) Après fixation et marquage des cellules à la phalloïdine. Les résultats de quantification de la longueur des neurites sont représentés sous forme d'histogramme. Les VEs semblent avoir un effet sur positif sur l'induction de la croissance neuritique des cellules PC-12. La significativité (** p < 0,01) a été calculée par T test apparié par ANOVA (la barre représente les erreurs standard de la moyenne). La barre d'échelle correspond à 20 µm.

1.4.2 Tests fonctionnels avec les VEs isolées par Optiprep™ (ODG)

Afin de déterminer si la croissance neuritique des neurones en culture est effectivement stimulée par la présence de VEs d'origine microgliale, une étape supplémentaire de purification du culot vésiculaire a été réalisée afin d'éliminer les éventuels agrégats protéiques. Dans cette dynamique, les tests fonctionnels ont été refait avec cette fois les fractions ODG-positives regroupées (F4, F5, F6). Une quantification NTA de ce nouvel échantillon a permis d'estimer le nombre de particules ajouté dans les milieux de culture. Les vésicules utilisées ont été conservées à 4°C sans les soumettre à congélation pour éviter tout risque de détérioration des structures ou perte d'activité biologique.

1.4.2.1 Sur les neurones de sangsue

Les neurones de sangsue, dont la taille est comprise entre 6-20 μm sont récupérés lors de la dissociation des cellules de la chaîne nerveuse et séparés des cellules microgliales par filtration. Ils sont remis en suspension dans un milieu dépourvu de vésicules extracellulaires et répartis dans 4 chambres de culture de type Labteck. A 6 jours de culture, 10^6 VEs provenant des fractions ODG-positives regroupées (F4, F5, F6) sont rajoutées aux neurones. La totalité de chaque puits est photographié à 6, 13 et 20 jours de culture à l'aide de la station de microscopie Nikon Eclipse Ti2. Pour chaque puits, les neurones présentant des neurites en croissance entre le J6 et J20 ont été sélectionnés. 44 neurones ont pu être suivis dans la condition VEs et 52 dans la condition contrôle (sans ajout de VEs). Pour chaque neurone sélectionné, l'ensemble de son réseau de neurites a été tracé manuellement avec le logiciel NeuriteTracer ImagJ sur les images prises à J6, J13 et J20 en microscopie photonique. Les tracés des neurites étaient convertis alors en micromètres. Un exemple de l'évolution de la croissance à travers le temps pour la condition vésicules est représenté en figure 40.

Les résultats de comparaisons multiples dans le logiciel de statistique GraphPad ont montré que les VEs microgliales de sangsue ont un effet sur l'induction de la croissance neuritique des neurones en culture primaire (graphe figure 40). Cet effet est statistiquement significatif entre les deux conditions contrôle (Ctrl) et vésicules (VEs) à J 20. De manière intéressante, en comparant la repousse neuritique au sein même de chaque condition, celle-ci est significative entre J6 et J13 et entre J13 et J20 dans la condition VEs, ce qui n'est pas le cas pour la condition contrôle. L'ensemble des résultats statistiques est mis sous forme de tableau 15 en annexe.

Résultats

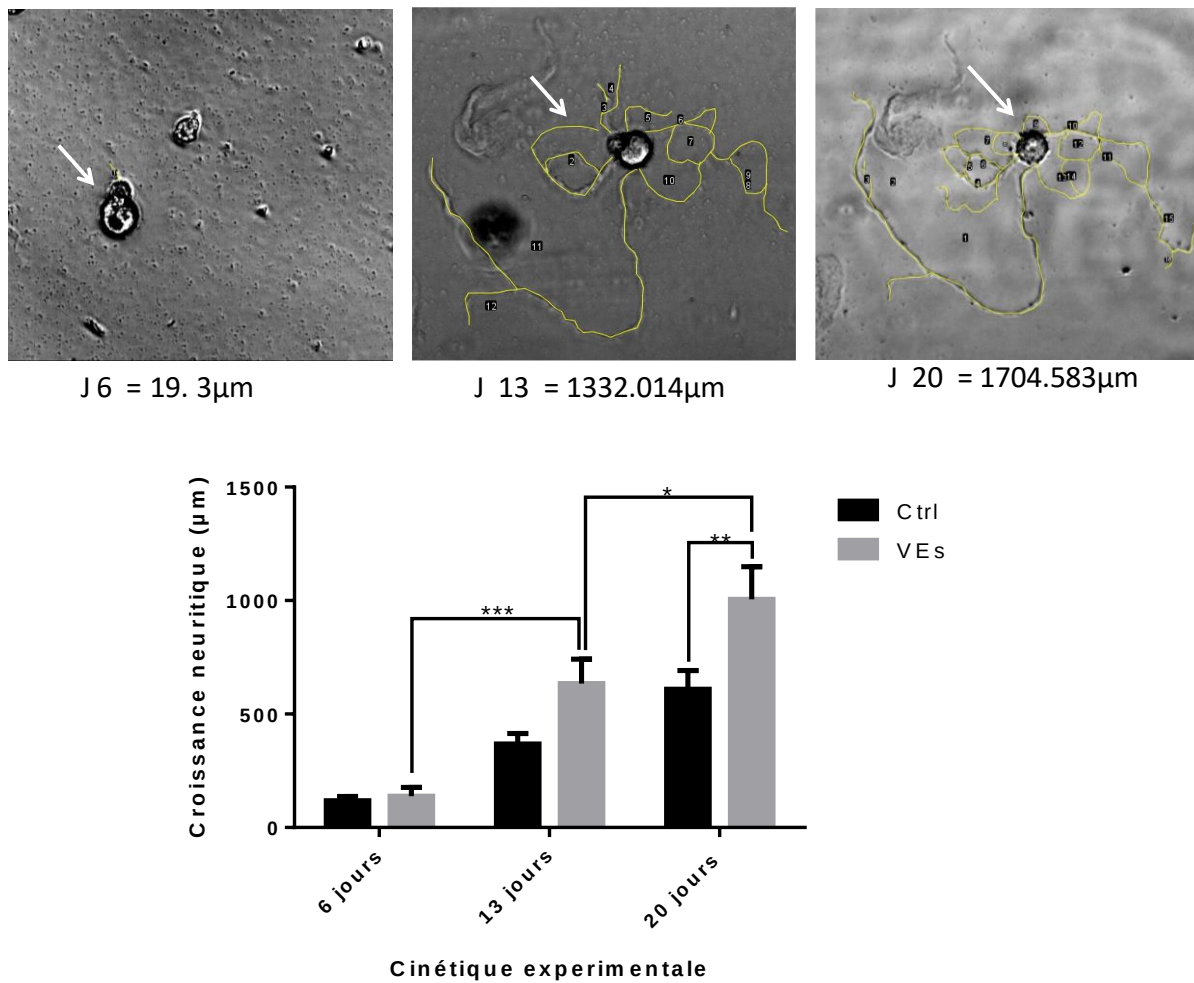


Figure 40 : Mesure de l'effet vésiculaire sur les neurones de sangsue. A, B et C : exemple de l'évolution de la croissance neuritique d'un neurone en présence de vésicules microgliales de sangsue. La longueur mesurée pour ce neurone évolue de 19.3 μm à 6 jours de culture à 1704.583 μm à 20 jours de culture. D : les histogrammes représentent la longueur des neurites (μm) des neurones sélectionnés mesurée à différents temps en présence de vésicules (VEs) (gris) comparée à la condition contrôle (Ctrl) (noir). La significativité (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001) a été calculée par T test apparié par ANOVA (la barre représente les erreurs standard de la moyenne)

1.4.2.2 Sur la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y

Pour ajuster la densité cellulaire, différentes quantités de cellules SH-SY5Y ($1,4 \times 10^4$, $2,2 \times 10^4$, $4,4 \times 10^4$ et $8,8 \times 10^4$ cellules) ont été réparties dans des plaques de 24 puits (surface d'un puits : 19 mm^2), dans un milieu de multiplication (figure 41 A, B, C, D). La condition nous semblant la plus adaptée pour la poursuite des tests c'est une quantité de cellules de $8,8 \times 10^4$ cellules/puits (figure 41 D) avec l'utilisation de la staurosporine à 25 mM comme agent de différenciation.

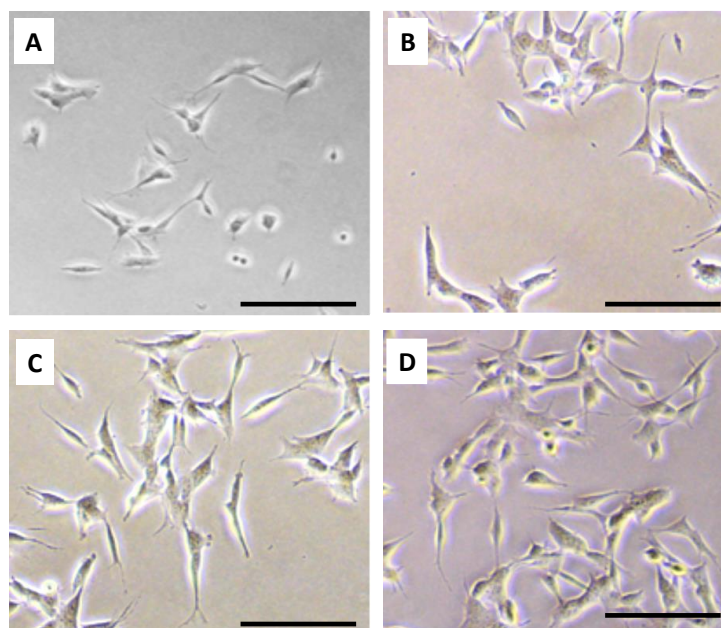


Figure 41 : Ajustement de la densité de cellules pour la culture des cellules SH-SY5Y. Des densités de $1,4$ (A), $2,2$ (B), $4,4$ (C) et $8,8$ (D) $\times 10^4$ cellules/puits ont été testées. D. Les cellules semblent à bonne confluence à $8,8 \times 10^4$ cellules/puits. La barre d'échelle est de $200 \mu\text{m}$.

Dans les puits de culture, les SH-SY5Y ont tendance à se développer plus en périphérie, ce qui rend la prise d'images assez compliquée. Dans le but d'améliorer l'acquisition d'images, les cellules SH-SY5Y ont été cultivées dans les puits sur des lamelles traitées à la poly-D-Lysine. Comme pour les PC-12, l'observation en microscopie photonique montre que des cellules s'infiltrèrent entre le fond du puits et la lamelle, rendant les prises de vue difficiles dans ces zones. De plus, morphologiquement les cultures semblent mieux sans poly-D lysine. Des tests de culture ont également été réalisés sur boîtes FluoroDish de même diamètre interne, dont le fond en verre, permet d'éviter l'utilisation de lamelles. Les prises de vue en fluorescence ont considérablement été améliorées sans nécessiter une nouvelle adaptation de la densité cellulaire. Différentes quantités de VEs, ont ensuite été ajoutées dans chaque puits : 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 et 10^9 vésicules/puits. Avec 10^4 VEs dans les puits, aucune induction de croissance neuritique supplémentaire n'a été observée. Avec 10^5 ou 10^6 VEs les cellules SH-SY5Y présentent un réseau de neurites relativement plus important que dans les puits témoins, avec des neurites

paraissant plus allongés avec 10^6 VEs (figure 42 A B et C). Avec 10^7 10^8 et 10^9 VEs dans les puits, les quantités semblent trop importantes car les cellules s'arrondissent et finissent par se détacher, cependant quelques prolongements neuritiques restent encore visibles à 10^7 et 10^8 VEs par puits (figure 42 D, E et F).

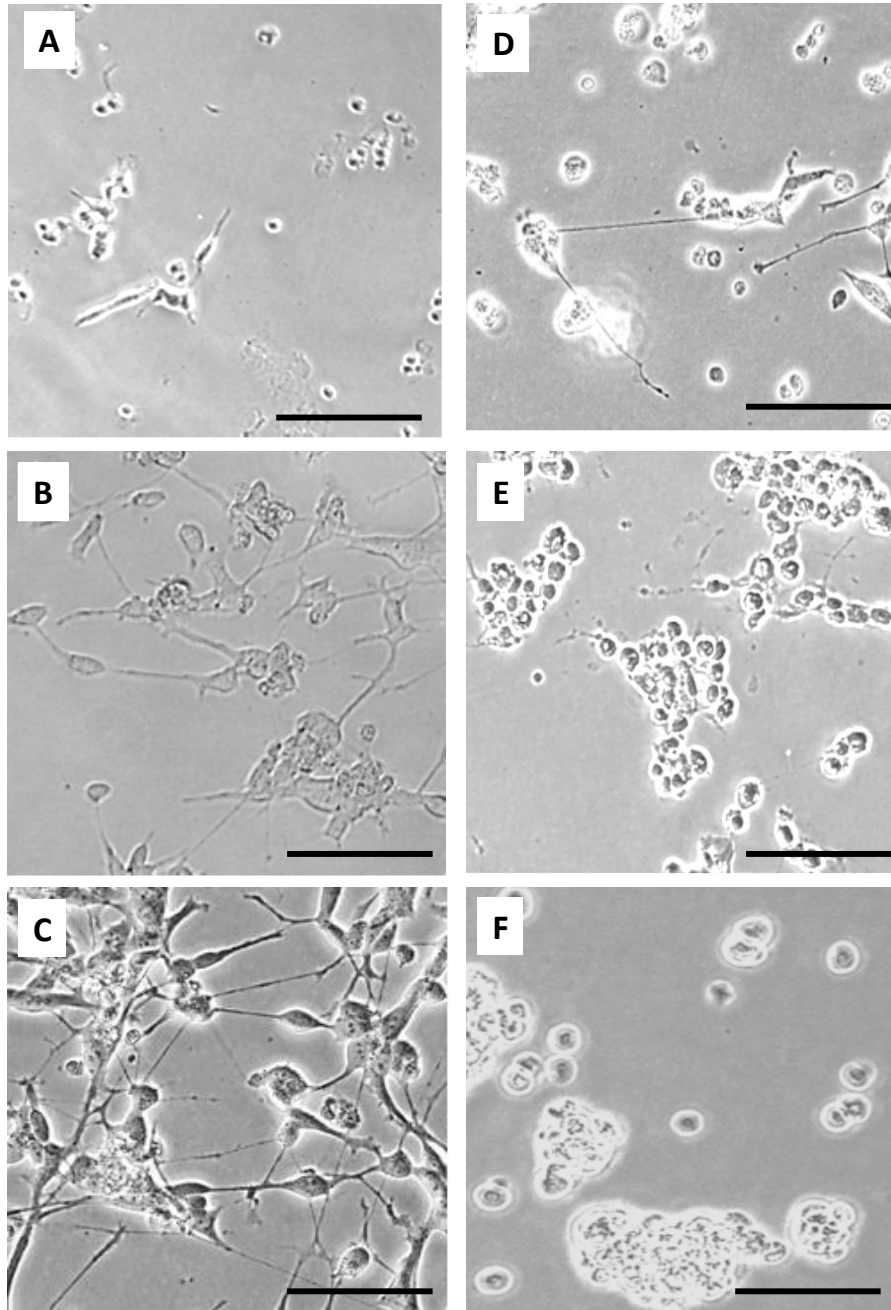


Figure 42 : Détermination de la quantité de vésicules extracellulaires nécessaires pour l'induction de la croissance neuritique sur les SH-SY5Y. Les lettres A, B, C, D, E et F indiquent les quantités croissantes de 10^4 à 10^9 particules ajoutées respectivement. Le suivi de la culture montre qu'à des faibles doses (A) les vésicules ne semblent pas avoir d'effet et que des quantités trop importantes deviennent toxiques (D, E, F), les cellules sont en souffrance. A 10^6 (C) les cellules semblent morphologiquement correctes et le réseau de neurites est important. La barre d'échelle correspond à 200 μm .

Résultats

Une fois les paramètres de culture établis, les expériences ont été réalisées en triplicatas dans les conditions optimales en termes de densité cellulaire (8.8×10^4 cellules/puits), de support de culture (FluorDish) et de quantité de vésicules ajoutées (10^6 VEs). Les cellules ont été fixées puis marquées à la phalloïdine. Des prises de vues au microscope à fluorescence ont été réalisées et utilisées pour mesurer la taille des neurites à l'aide du logiciel NeuriteTracer en comparaison de la condition contrôle sans ajout de VEs (figure 43 B). Visuellement, le réseau de neurites des cellules SH-SY5Y est plus développé en présence de vésicules comparé au contrôle (flèches figure 43 A). Cependant, les tentatives pour mesurer la taille des neurites à l'aide du logiciel NeuriteTracer, sont restées infructueuses, le logiciel ne parvenait pas à détecter et quantifier les neurites.

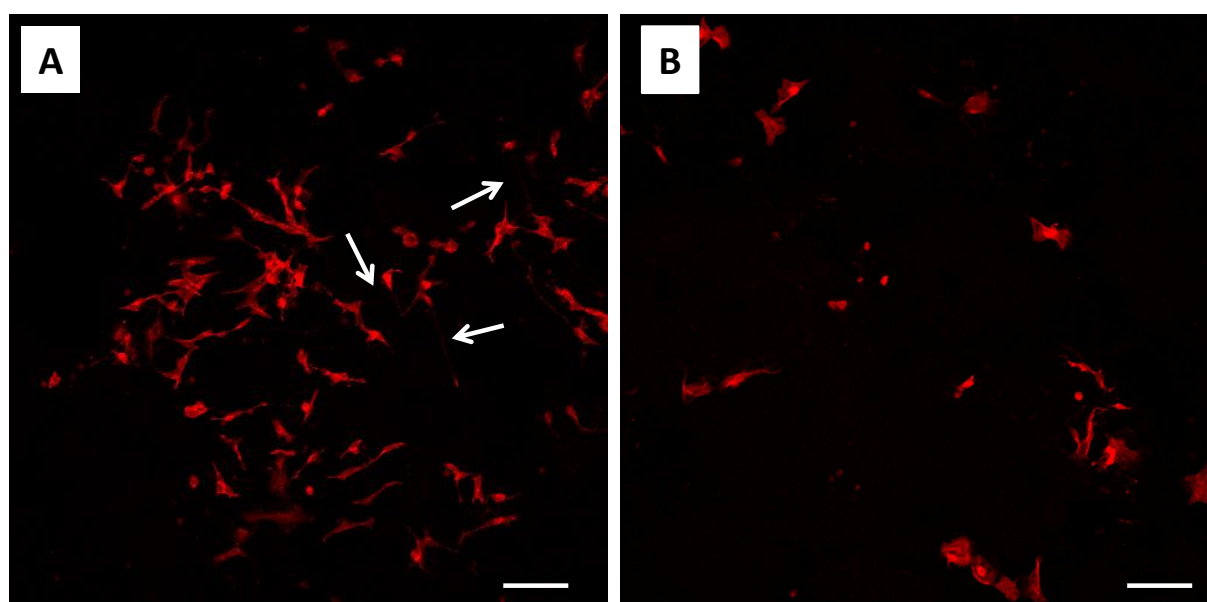


Figure 43 : Mesure de l'effet vésiculaire sur les cellules SH-SY5Y. Les cellules fixées ont été marquées à la phalloïdine en comparant la condition 10^6 vésicules ajoutées (A) à la condition contrôle sans VEs (B). Les résultats de quantification de la longueur des neurites n'ont pas pu être établis dans le logiciel Neurite Tracer malgré une différence visuelle notable entre les deux conditions. La barre d'échelle correspond à 100 μm .

Au vu du temps et du coût de telles expériences, nous avons initié une collaboration avec la société HCS Pharma, une startup récemment installée à Lille, spécialisée dans le criblage phénotypique à haut débit sur différents types cellulaires et notamment les cellules SH-SY5Y. Les premiers tests effectués montrent un effet des VEs par rapport à la condition contrôle mais celui-ci n'est statistiquement pas significatif. Ces expériences sont amenées à être optimisées car les conditions de culture sont plus standardisées chez HCS Pharma et demandent encore des mises au point que nous n'avons pu à l'heure actuelle réaliser (figure 44).

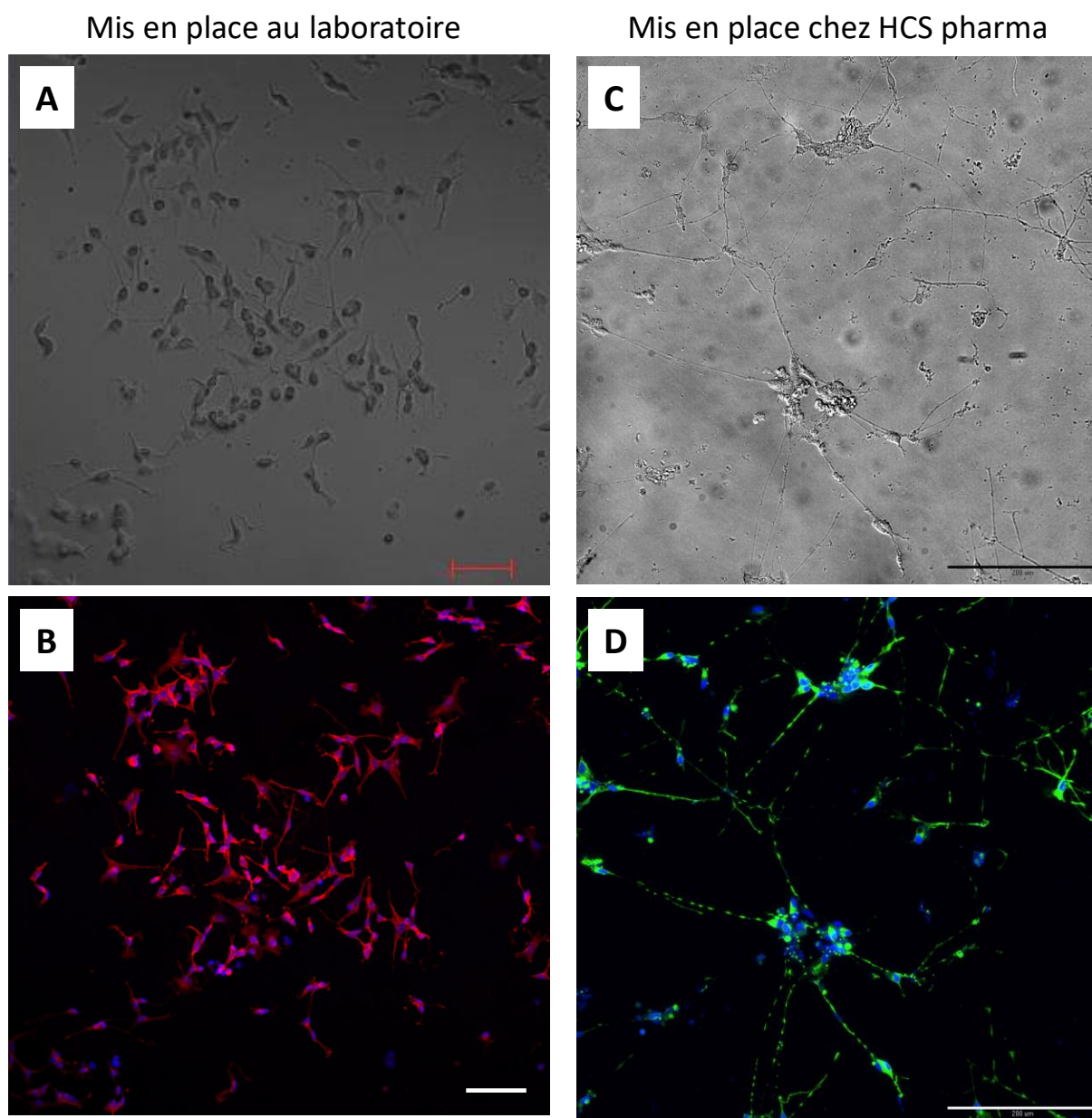


Figure 44 : Comparaison entre les optimisations réalisées au laboratoire et chez HCS Pharma. A et B : au laboratoire les SH-SY5Y cultivées à 8.8×10^4 cellules dans des fluorodish à fond en verre, l'effet vésiculaire est testé avec 10^6 particules. Les cellules sont fixées et marquées à la phalloïdine (rouge). Les noyaux ont été mis en évidence avec du Hoechst. La barre d'échelle indique 100 μm . C et D : Les SH-SY5Y cultivées chez HCS Pharma dans des plaques 96 puits à fond en verre à 7.5×10^3 cellules par puits. L'effet vésiculaire est testé avec 10^6 particules. Les cellules sont ensuite fixées et marquées à la tubuline (vert). Les noyaux ont été mis en évidence avec du Hoechst. La barre d'échelle indique 200 μm .

DISCUSSION

Au cours de la dernière décennie, le nombre de publications dans le domaine des vésicules extracellulaires est en croissance exponentielle. La société internationale sur les vésicules extracellulaires (ISEV) par ses prises de position [61,303] s'emploie à améliorer différents aspects du domaine, notamment la purification, la nomenclature et les applications des vésicules extracellulaires (VEs).

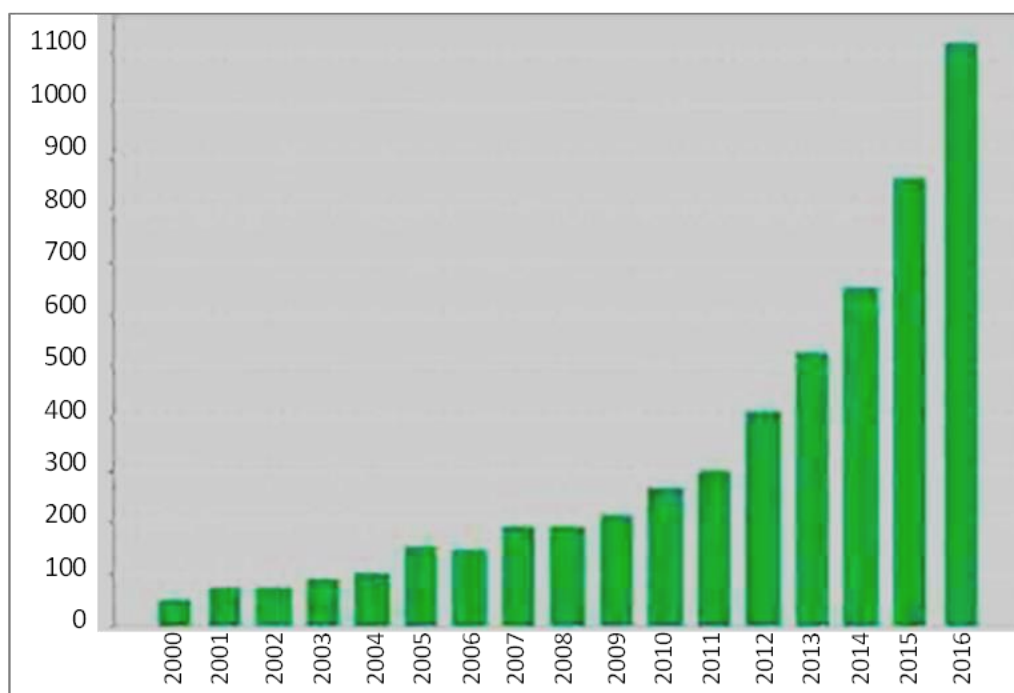


Figure 45 : Evolution des articles sur les vésicules extracellulaires (source : Web of Science/Journal Citation Reports). Les histogrammes indiquent le nombre d'articles publiés chaque année pour la période 2000-2016. (Réimprimé avec permission, de [304]. Copyright the Author(s) 2018).

Par cette étude nous avons voulu mettre en avant l'effet des vésicules extracellulaires d'origine microgiale de sangsue sur l'induction de la croissance neuritique de neurones de sangsue dans un premier temps et de lignées cellulaires de mammifères dans un second temps. Dans notre démarche, il était important de faire évoluer le protocole d'isolement des vésicules afin de minimiser la présence de contaminations comme des ribonucléoprotéines agrégées et des lipoprotéines. La teneur de ces contaminants dans le culot de vésicules isolées, diffère grandement en fonction du protocole utilisé. Des études ont montré que la présence de ces co-isolats, ainsi que les traces résiduelles d'agents chimiques présents dans les kits commerciaux, peuvent affecter considérablement les résultats obtenus dans des tests fonctionnels [305,306].

Au cours de ce travail de thèse nous avons comparé l'isolement de VEs par ultracentrifugation (culot-UC) et l'isolement de VEs par ultracentrifugation sur gradient de densité d'Optiprep™ (ODG). Nous avons également analysé leur contenu protéique. Plusieurs rapports décrivent des études similaires de comparaison de méthodologie souvent effectuées sur des lignées cellulaires de mammifères [307,308]. L'aspect novateur de l'étude présentée dans ce manuscrit est que l'ensemble des vésicules étudiées sont d'origine microgliale, c'est à dire issues de cellules du système nerveux central (SNC) de la sangsue médicinale, un annélide qui possède des capacités importantes de régénération nerveuse. De plus, l'ensemble des fractions ODG obtenues ont été analysées individuellement en spectrométrie de masse, contrairement à ce qui est le plus couramment publié, à savoir la caractérisation exclusive des fractions contenant les VEs [273,309].

L'efficacité des deux techniques d'isolement de vésicules extracellulaires a été évaluée par différentes technologies appliquées aussi bien sur le culot-UC que sur les fractions ODG. Le suivie et l'analyse de nanoparticules en suspension par NTA a permis de déterminer le rendement en particules, les observations en microscopie électronique à transmission (MET) ont conduit à apprécier la morphologie des vésicules isolées et l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a servi à déterminer l'identité de leur profil protéomique. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicatas sur des vésicules libérées par des cellules microgliales de sangsue en cultures primaires. Les résultats indiquent que les deux méthodes conduisent à l'isolement de VEs, comme le montre la microscopie électronique à transmission (figure 29). Néanmoins, par des approches de spectrométrie de masse, nous avons confirmé que l'ODG permettait d'obtenir les préparations de VEs plus pures (figures 30, 31 et 32), ce qui se traduit par des signatures vésiculaires plus importantes.

L'analyse par NTA des nanoparticules a été réalisée sur des vésicules extracellulaires purifiées par ultracentrifugation différentielle et par gradient de densité Optiprep™ (figure 28). Les résultats ont montré la présence de particules dans les échantillons UC et certaines fractions ODG. Comme attendu, le nombre de particules était plus élevé dans les échantillons UC en raison de l'ajout d'étapes supplémentaires dans le protocole de purification en gradient ODG, protocole qui comporte une perte de matériel. De plus, la technologie NTA n'est pas assez résolutive pour faire la différence entre des vésicules extracellulaires et des agrégats et contaminants protéiques. De ce fait, les résultats obtenus permettent une estimation du nombre de particules dans l'échantillon analysé, cependant des analyses complémentaires sont nécessaires pour déterminer la nature du contenu isolé par UC et ODG. Nous avons également remarqué des variations dans la quantification des particules et des valeurs d'écart-type élevées

pour de nombreuses fractions. Ces variations sont probablement causées par le manque d'estimation précise du nombre de cellules microgliales utilisées pour chaque réplica. En effet la petite taille de la microglie de sangsue en culture ($\leq 5 \mu\text{m}$) (figure 25) rend difficile le comptage cellulaire et l'estimation de leur viabilité par coloration classique au bleu trypan. Pour pallier cette contrainte expérimentale du modèle, nous avons utilisé le nombre de chaînes nerveuses disséquées comme facteur de normalisation entre les trois réplicas biologiques au lieu du nombre de cellules microgliales viables mises en culture. Pour chaque réplica protéique nous avons donc utilisé 20 chaînes nerveuses et la totalité des VEs microgliales purifiées a été analysée. Pour les tests fonctionnels, 20 chaînes ont également été utilisées pour chaque réplica. En plus, le nombre de particules a été estimé par la technologie NTA pour déterminer les quantités de VEs nécessaires pour induire la croissance neuritique des neurones en culture.

Les observations MET ont confirmé la présence de vésicules extracellulaires dans les culots UC (figure 29B) et principalement dans les fractions ODG F4, F5 et F6 (figure 29A). Dans les deux conditions, en raison de l'étape de filtration sur filtre de $0,22 \mu\text{m}$ avant l'ultracentrifugation à $100\,000 \text{ g}$, les grandes vésicules de plus de 500 nm de diamètre n'ont pas été observées. La gamme de taille des vésicules isolées est cependant apparue assez large ($50\text{-}500 \text{ nm}$), ce qui confirme que les protocoles expérimentaux appliqués ici ne permettent pas de séparer les vésicules extracellulaires par taille. Certaines vésicules extracellulaires semblaient plus denses aux électrons que d'autres (flèche, figure 29A), ce qui signifie que la qualité et la quantité du matériel contenu ne sont pas identiques pour toutes les vésicules extracellulaires, et reflète l'hétérogénéité des populations de vésicules.

Globalement, ces résultats ont confirmé que les cellules microgliales de sangsue en culture primaire ont la capacité de produire et sécréter des vésicules extracellulaires.

Dans les analyses en MET nous avons constaté, dans les échantillons UC, la présence sur le fond de nanoparticules globulaires dont la morphologie ressemble à ce qui été précédemment décrit dans la littérature comme des lipoprotéines d'environ 15 nm [310]. Ces particules lipidiques n'ont pas été observées dans l'isolement par ODG (figure 29A). Les images de microscopie électronique tendent à suggérer que le protocole d'isolement en OptiprepTM permet d'éliminer au moins une catégorie de contaminants, à savoir les lipoprotéines.

Les analyses MET ont également révélé, dans des fractions UC et ODG, la présence de vésicules agrégées (figure 29C). Celles-ci pourraient résulter de la force de centrifugation appliquée sur l'échantillon pendant l'étape d'ultracentrifugation. La présence de ces complexes

Discussion

vésiculaires est problématique aussi bien en NTA qu'en MET car la quantification précise du nombre de VEs devient alors impossible, d'autant que ces agrégats n'ont pas une répartition homogène sur la grille. En effet, le volume de milieux conditionné initial utilisé pour la collecte des vésicules est de 5 mL. Ce volume est assez important pour récupérer un nombre suffisant de vésicules et faire certaines expériences (analyses protéomiques, immunoblots, tests fonctionnels...) mais il n'est pas suffisant pour obtenir une distribution riche et homogène de VEs sur l'ensemble de la grille pour l'observation en MET.

En analyse NTA, l'agrégation des vésicules entre elles est également problématique. En effet, la taille des vésicules de l'échantillon analysé se voit surestimée par la présence de tels complexes alors que la quantité de VEs détectées est sous-estimée. Souvent ceci se traduit par des profils polydispersés générés par le logiciel dédié.

Pour déterminer si les particules comptées sont effectivement des vésicules extracellulaires ou des contaminants, et parce que la technologie NTA ne fait pas de différence entre les vésicules extracellulaires et les agrégats de protéines, tous les échantillons ont été analysés par Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS / MS). Des études précédentes montrant l'effet de l'ATP sur la microglie de sangsue [22,36] et la présence de signatures de récepteurs purinergiques dans les banques de donnée sangsue nous ont encouragé à utiliser l'ATP comme activateur des cellules microgliales, capable de stimuler une production de VEs plus importante. Les résultats ont montré des fluctuations de la quantité de vésicules mesurées au NTA en fonction des différentes concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mM) en ATP pour atteindre un pic à 1mM (figure 27 B). Cependant l'analyse en spectrométrie de masse des échantillons activés et non activés montre qu'il n'y a pas de différences significatives en nombre et en qualité de protéines. Ce qui suggère que l'augmentation des vésicules extracellulaires observée au Nanosight, n'est peut-être pas liée qu'au transport de protéines, cependant d'autres études seront nécessaires pour valider ou non cette hypothèse. Notamment, il est nécessaire de faire des études cinétiques en testant plusieurs temps d'activation des cellules microgliales en présence d'ATP, car pour l'instant le seul temps d'activation testé était de 1h. Il peut être également nécessaire de caractériser le (s) récepteur(s) purinergique(s) chez la sangsue dont des signatures ont été retrouvé dans la banque de donnée sangsue et de pouvoir les inhiber sélectivement afin d'estimer leur implication dans le relargage des VEs. Pour éviter un nombre de mises au point trop important, le travail présenté dans ce manuscrit a été uniquement ciblé sur les vésicules extracellulaires isolées de cellules microgliales mises en culture après dissection de la chaîne nerveuse sans stimulation par de l'ATP exogène. Il serait

également intéressant de tester d'autres stimuli. En effet, les molécules comme *HmC1q*, *HmIL16* et *HmEmapII* semblent être de bons candidats [26,27,34].

Les analyses LC-MS/MS ont confirmé la présence de vésicules extracellulaires dans les échantillons UC et dans les fractions à gradient de densité ODG. Malgré le nombre plus faible de particules détectées dans les fractions ODG par rapport au culot UC, la quantité de protéines identifiées dans ces échantillons était significativement plus élevée. Les analyses MS ont été obtenues en Data Dependent Acquisition (DDA), ce qui signifie que seuls les 10 ions les plus intenses sont sélectionnés et fragmentés pour obtenir des données MS/MS. Par conséquent, seules les protéines majoritaires des échantillons sont détectées. Cela pourrait expliquer l'identification d'un nombre moindre de protéines dans les échantillons UC comparé aux fractions ODG car, le protocole d'isolement étant moins poussé, les contaminants y sont plus nombreux et donc majoritairement détectés par rapport aux protéines signatures vésiculaires. Le fractionnement est l'une des recommandations dans les protocoles d'analyse par spectrométrie de masse pour augmenter le taux de détection de protéines de VEs en mode DDA [64]. Le protocole d'isolement ODG, avec une étape de purification supplémentaire par gradient de densité, permet de séparer les vésicules extracellulaires des contaminants protéiques potentiels en fonction de leurs propriétés différentes de flottaison. Cette purification supplémentaire a effectivement permis une meilleure détection de protéines vésiculaires par DDA. Nous avons ainsi identifié 354 protéines dans l'échantillon UC, dont 242 se chevauchent avec les fractions ODG positives (F4, F5, F6). Lors de l'analyse des 112 protéines exclusivement présentes dans les culot-UC, nous n'avons pas détecté de molécules bien connues associées aux vésicules extracellulaires. Ces protéines appartiennent à plusieurs compartiments cellulaires, notamment le noyau, le cytosol et le cytoplasme (membres de la famille des histones, apolipoprotéines, caspases, actine, tubuline et membres de la famille de la protéine kinase II dépendante du calcium / calmoduline, cytochrome C1...). De manière intéressante, lors de l'isolement par gradient de densité, ces protéines se sont réparties dans les fractions ODG négatives F1, F2, F3, F7 et F8 (figure 30). Ces données confirment l'intérêt du protocole ODG pour l'élimination des contaminants protéiques des vésicules extracellulaires. Certaines protéines (par exemple actine, GAPDH, protéines de la famille HSP) de la liste ExoCarta top100 (tableau 4) ont été identifiées dans toutes les fractions ODG (F1 à F8). Cependant, ces molécules ne sont pas strictement spécifiques des vésicules extracellulaires, et pourraient être impliquées dans différents processus / voies cellulaires. C'est pourquoi, pour évaluer de manière stricte la présence de marqueurs de vésicules, des études complémentaires doivent être menées

pour établir leur localisation cellulaire précise [291]. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier 644 protéines dans les fractions ODG F4, F5 et F6. La MET sur ces fractions montre qu'elles sont effectivement enrichies en vésicules extracellulaires (figure 29 a). La quantité de protéines détectées est corrélée au nombre plus élevé de particules comptées par NTA dans ces fractions (figure 28B). Enfin, nous avons observé une augmentation considérable des signatures de protéines EVs par la comparaison avec les 100 protéines majoritairement décrites dans ExoCarta (tableau 4).

Un nombre relativement élevé de protéines, a également été détecté dans les fractions F3 et F7, physiquement proches des fractions positives dans les strates du gradient (tableau 4). Les VEs ne sont pas supposés être présentes à la densité théorique de ces fractions, 1,078 g/mL et 1,223 g/mL, respectivement [311]. En effet, les exosomes flottent à des densités entre 1.15 et 1.19 g/mL [64]. La présence de signatures vésiculaires dans ces deux fractions peut être expliquée par la procédure expérimentale conduisant à une contamination partielle entre les couches de gradient lors de la collecte des fractions. En effet, la récupération manuelle et l'aspiration avec une pipette, aussi délicates soient elles, peuvent induire des contaminations d'une phase du gradient à une autre. Une récupération des strates par aspiration à l'aide d'une pompe pourrait être envisagée en guise de comparaison. La limite de cette technique est de devoir introduire un capillaire à travers les phases du gradient sans pour autant le mélanger. Ceci reste une étape fastidieuse.

Les tétraspanines 1, 7 et 11 ont été détectées dans certaines des fractions positives. En revanche, certains marqueurs largement décrits dans les vésicules extracellulaires, tels que les tétraspanines CD9, CD63 ou CD81, n'ont pas été détectés dans nos analyses protéomiques. Cela peut s'expliquer par le fait que l'approche DDA permet la détection des 10 ions les plus intenses, ce qui suggère que ces molécules peuvent être présentes mais non détectables car minoritaires dans l'échantillon. Pour évaluer la présence de ces tétraspanines et d'autres marqueurs tels qu'Alix ou HSP70 dans les VEs de la microglie de sangsue, nous avons effectué des analyses par immunohistochimie *ex vivo* sur des portions de chaînes et par immunoblot. Nous avons obtenu des résultats positifs avec l'anticorps polyclonal anti-Alix aussi bien en immunoblot qu'en immunohistochimie. Ceci confirme bien que l'utilisation d'anticorps polyclonaux est une alternative efficace pour des molécules bien conservées comme Alix. Le fait de ne pas avoir obtenu de signal avec les anticorps monoclonaux utilisés (anti-CD9, anti-TSG 101, anti-flotilline 1 et anti-HSP70) peut s'expliquer dans un premier temps par l'étiquette monoclonal de ces anticorps, ce qui réduit la possibilité de reconnaissance de la molécule *Hm*. Il se peut

également que ces marqueurs sont présents en faible quantité dans les vésicules microgliales de sangsue, d'autant plus que CD9 et Tsg 101 n'ont pas été détectés en spectrométrie de masse non plus. C'est dans ce cadre là que l'utilisation d'anticorps polyclonaux reste toutefois possible et intéressante, sachant que la recherche de certains marqueurs vésicules-spécifiques dans les banques de données de sangsue a donné des résultats positifs, confirmant chez *Hirudo* la présence de gènes homologues aux marqueurs vésiculaires des mammifères comme Alix (Figure 35), CD9, CD63, Hsp70 et Tsg 101 (figure 1 en annexe).

Les analyses ontologiques ont confirmé la présence, dans les échantillons UC (tableau 11 annexe) et les fractions ODG (tableau 10 annexe), de termes appartenant à différentes catégories du classement par "Gene Ontology (GO)" liés aux VEs. Néanmoins, le nombre de gènes enregistrés est plus élevé et les valeurs de *p* obtenues plus faibles donc statistiquement plus fiable dans les échantillons purifiés par gradient de densité. Ces données confirment que le traitement ODG pour la purification des vésicules extracellulaires est plus efficace par rapport à l'ultracentrifugation simple (figure 32). Les résultats présentés ici démontrent que dans les vésicules extracellulaires secrétées par la microglie de sangsue sont présents de nombreux marqueurs généralement décrits pour les vésicules de mammifères. Nous avons identifié des molécules appartenant à la cartographie classique des VEs [312] avec la prédiction des localisations et fonctions suivantes : transmembranaires (famille des tétraspanines, des intégrines), intracellulaires (protéines RAB), trafic membranaire (flotilline, annexine, RHO), associées à des corps multivésiculaires (clathrine, ubiquitine), chaperon (membres de la famille HSP), signalisation (ARF1, EGFR, CDC42, β caténine, famille 14-3-3), enzyme (GAPDH, Enolase, ATPase) et des protéines cytosquelettiques (actine, moesine, kératines). En plus de ces composants génériques, l'analyse protéomique a révélé la présence de protéines neuronales telles que le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) et la fasciclin (NCAM), impliquées dans la croissance des neurites. Des études plus poussées sur ces deux molécules et leurs récepteurs devront être menées afin de valider leur présence ainsi que leurs fonctions dans un contexte de croissance neuritique.

Nous avons également identifié aussi bien dans le culot-UC que dans les fractions ODG positives, des protéines spécifiques du système nerveux de la sangsue, telles que la gliarine, une protéine des filaments intermédiaires spécifique des cellules gliales [313]. De manière intéressante, des structure vésiculaires ont été montrées comme positives à la gliarine (figure 37). La neurohémythrine, un facteur neuro-immunitaire [314] a également été retrouvé dans les liste de protéines identifiées. Prises ensemble, ces données suggèrent une conservation

générale des vésicules extracellulaires de sangsue en termes de teneur en protéines et, plus spécifiquement, de leur implication potentielle dans des événements associés à la réparation nerveuse (figure 46).

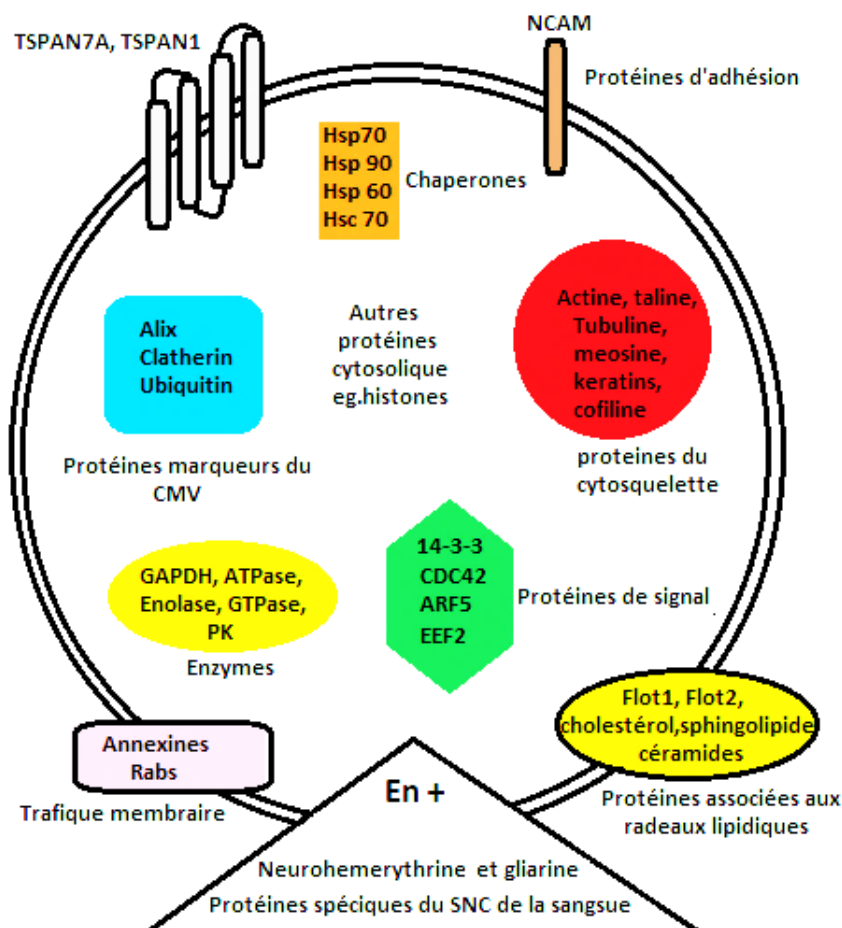


Figure 46 : Représentation d'une vésicule extracellulaire microgliale de sangsue. Reconstruction de la cartographie d'une vésicule extracellulaire d'origine microgliale de sangsue d'après les identifications protéiques obtenues. Toutes les protéines ne sont pas représentées.

Les résultats préliminaires d'études fonctionnelles visant à évaluer l'activité neurotrophique potentielle des VEs microgliales de sangsue *in vitro* indiquent un effet positif sur la croissance des neurites. Des neurones de sangsue de taille comprise entre 6 et 20 μm , ont été mis en culture en chambre Labtek, dans un milieu sans vésicules. Ils sont issus du même lot de chaînes nerveuses utilisées pour préparer les cultures de cellules microgliales destinées à produire les VEs pour ces tests de croissance neuritique. Pour les cultures de neurones, les puits ont été assignés de manière aléatoire entre contrôle et conditions expérimentales (ajout de VEs). Les neurones de sangsue, après 6 jours de culture, ont été mis en présence des VEs d'origine

microgliale. Une acquisition d'images a été réalisée en mosaïque, permettant de suivre tous les neurones présents dans les chambres de culture, contrôle et exposées aux VEs. Pour l'analyse de la croissance neuritique nous avons fait le choix de ne suivre que les neurones présentant des neurites aux trois temps de culture. La robustesse de l'expérimentation réside en effet dans ce paramètre avec $n=44$ neurones dans la condition VEs et $n=52$ dans la condition contrôle. L'ensemble de ces neurones a été suivi sur 21 jours de culture avec des prises d'image à j6, j13 et j20. Le choix de ne pas marquer les neurones était motivé par le fait que les marqueurs vitaux de type lectiniques laissent des halos autour des neurones rendant les images en microscopie peu exploitables. De plus un marqueur type phalloïdine peut s'avérer toxique pour les cellules, surtout sur une durée de culture de 21 jours. Nous avons donc fait le choix de ne pas ajouter un facteur chimique dans la culture qui aurait pu interférer avec le métabolisme cellulaire et altérer l'observation de l'effet vésiculaire. Nous aurions pu fixer les neurones à la suite de la dernière acquisition (21j) et mesurer la longueur des neurites de manière automatisé au dernier jour de l'expérimentation, cependant nous voulions rester comparatif il était donc primordial que toutes les mesures se fassent dans les mêmes conditions pour tous les points cinétiques. En absence de fluorophore, la mesure des neurites a été réalisée manuellement. Les résultats ont montré qu'en présence de VEs, la croissance neuritique est significativement augmentée. A ce stade de l'étude, les mécanismes d'induction ne sont pas encore connus. Plusieurs facteurs peuvent entrer en jeu notamment un effet trophique des vésicules induisant la croissance des neurites ou encore une cascade de signalisation médiée par les vésicules dans le cadre de la croissance neuritique. Cette éventualité est renforcée par l'identification en analyse par spectrométrie de masse de protéines comme VAMP (*Vesicle-Associated Membrane Protein*), précédemment montré pour être impliquée dans la croissance neuritique [315].

Nous avons également été encouragé par des résultats obtenus au laboratoire, où le nGDF un membre de la famille TGF- β (*transforming growth factor_β*) a été démontré comme étant impliqué dans le dialogue microglie-neurones. Il reste à voir le rôle qu'aurait le TGF- β dans un processus d'induction de la croissance neuronale. De ce fait, des expériences *in vitro* ont été effectuées sur des cultures primaires de neurones en présence de VEs et de l'inhibiteur de la voie de signalisation nGDF, le SB431542. Nous avons pu démontrer à travers la mesure de la longueur des neurites, qu'en présence de l'inhibiteur la croissance neuritique diminue significativement (figure 47). Ces résultats suggèrent que la voie nGDF serait activée dans les processus de croissance neuritique. Ces résultats nous encouragent à réaliser des études complémentaires, en outre l'analyse du protéome des neurones et l'investigation des variations

moléculaires induite par les différents traitements, aiderait à mieux comprendre les mécanismes qui régissent l'interaction vésicules-neurones.

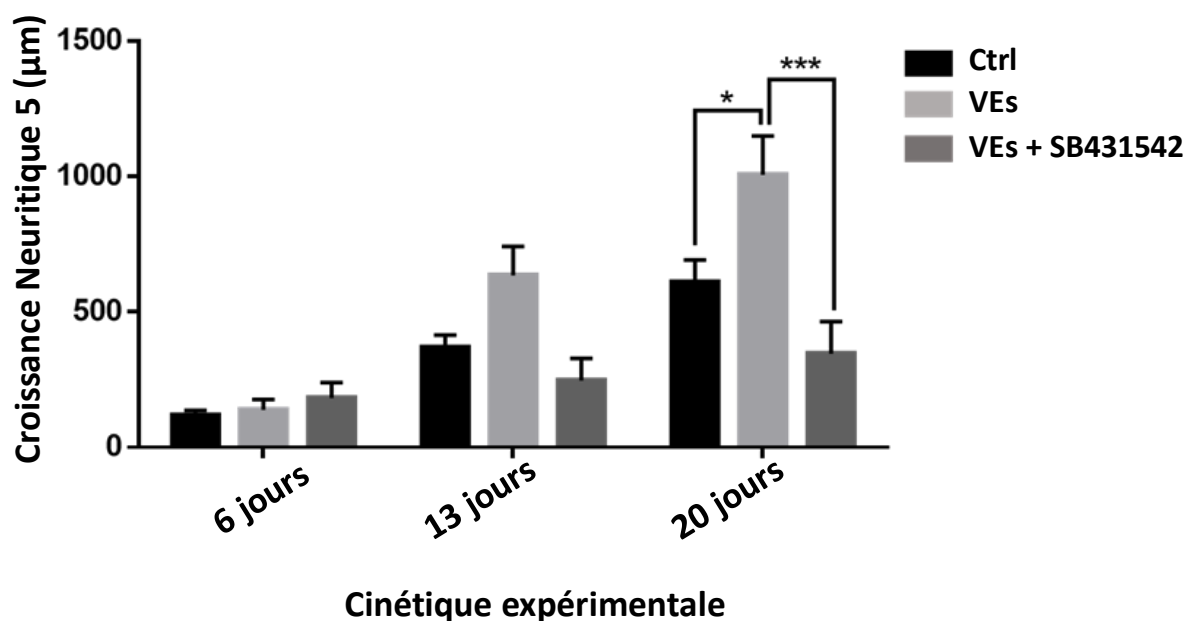


Figure 47 : Influence du TGF- β dans les essais de croissance neuritique. Les neurones de sangsue cultivés en présence des vésicules enrichies à partir du protocole ODG, ont été comparées d'une part aux neurones cultivés en présence des mêmes vésicules mais avec l'ajout d'un inhibiteur de la voie de signalisation TGF- β (SB431542) ou des contrôles milieux seul sans VEs et sans inhibiteur. Après mesure de la longueur des neurites, la condition activée par les VEs a montré une excroissance nettement supérieure au jour 20 par rapport au contrôle. La présence d'inhibiteur de SB431542 dans les cellules soumises à une activation par les VEs montrait une croissance nettement plus faible au jour 20 par rapport à la fraction enrichie en VEs seule. La significativité (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) a été calculée par T test apparié par ANOVA (la barre représente les erreurs standard de la moyenne).

Les tests effectués sur les cellules médullosurrénales de rat PC-12 ont été réalisés en ajoutant un volume de vésicules remises en suspension post ultracentrifugation. Comme décrit ci-dessus, ce culot UC contient des vésicules mais est également quelques contaminants. De ce fait, ces premiers tests sur les PC-12 ne permettent pas de déterminer si l'effet observé sur la croissance est attribuable exclusivement aux vésicules.

Cependant, nous avons choisi de ne pas refaire les tests sur les PC-12 avec des vésicules issues de l'isolement ODG, car ces cellules sont d'origine médullosurrénale et non pas neuronal, malgré leur capacité à se différencier en neurone dans un milieu adéquat, notamment par la déplétion en sérum. Les tests fonctionnels suivants ont donc été réalisés sur une lignée de neuroblastomes humain, les SH-SY5Y au laboratoire et dans le cadre d'une collaboration avec la société HCS Pharma, spécialisée sur le criblage phénotypique à haut débit de lignées cellulaires. Sur la base de ce qui a été mis en place au laboratoire, les VEs ajoutées sur les SH-

SY5Y ont été quantifiées par NTA à partir du mélange des fractions ODG-positives (F4, F5, F6). Une quantité de 10^6 vésicules a été déterminée comme optimale pour induire une croissance neuritique sur cette lignée. En outre, lors de ce type de tests il est impératif de rester vigilant sur nombre de passages des cellules en culture, au support utilisé pour la culture et à la qualité du milieu, car il n'est pas rare que d'un lot de sérum à un autre les cellules ne montrent pas la même morphologie. Dans notre étude, nous avons eu des difficultés à reproduire les résultats obtenus au laboratoire chez HCS pharma. Un des biais pourrait être l'estimation des VEs à ajouter en se basant sur le NTA. Comme nous l'avons vu, cette technologie ne fait pas la différence entre des vésicules extracellulaires et des particules artefactuelles. Une standardisation basée non pas sur un comptage vésiculaire mais sur un dosage protéique pourrait être envisagée dans le cadre de ces expériences [303]. Comme solution, d'autres lignées cellulaires ont été testées, notamment les N1E115, issues d'un neuroblastome de rat qui présentent des tailles de neurites plus importantes, Ce qui semble être de bonnes conditions pour des mesure de croissance neuritique par les logiciels dédiés notamment Neurite Quant et Neurite Tracer (figure 48). L'optimisation et la standardisation du protocole expérimental dans ces études translationnelles reste une étape nécessaire.

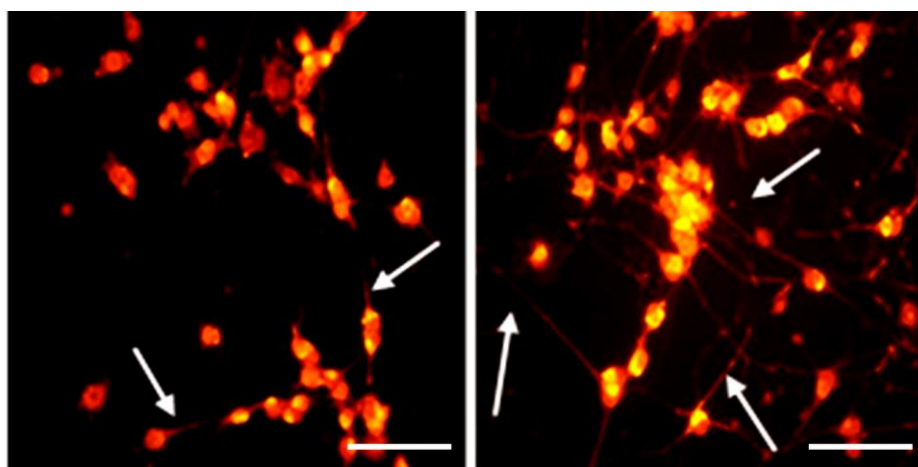


Figure 48 : Test préliminaire de l'effet vésiculaire sur les cellules N1E115 (neuroblastome de rat). Les cellules fixées ont été marquées à la phalloïdine en comparant la condition contrôle sans VEs (**gauche**) à la condition avec 10^6 vésicules ajoutées (**droite**). Les observations (flèches) semblent indiquées plus de neurites dans la condition avec VEs. La barre d'échelle correspond à 20 μ m.

En outre, notre étude a permis grâce à la comparaison de deux techniques d'isolement des VEs et à une étude protéomique exhaustive, de caractériser les protéines des vésicules extracellulaires d'origine microgliale chez la sangsue. Nous avons démontré qu'un isolement en gradient de densité d'OptiprepTM (ODG) permet l'élimination de contaminants et améliore la qualité de l'analyse des vésicules extracellulaires. Cette stratégie, dans la mesure du possible,

Discussion

devrait être appliquée à toutes les méthodes d'analyse " omiques ". Cette optimisation de l'isolement et de la purification des vésicules extracellulaires a été une étape cruciale dans la réalisation des tests fonctionnels afin d'établir leur rôle dans le dialogue neurone-microglie. Des études antérieures ont démontré que des sous-populations de microglies activées sont recrutées sur le site de la lésion dans le SNC de sangsue [28]. Dans la présente étude nous avons montré que ces cellules microgliales activées sont capables d'une sécrétion importante de vésicules extracellulaires. Par la combinaison de techniques de caractérisation du cargo protéique et de tests fonctionnels *in vitro*, des premiers éléments indiquent que ces vésicules ont un effet sur l'induction de la croissance neuritique et donc un potentiel effet neurotrophique.

CONCLUSION/PERSPECTIVES

Lors de ces dix dernières années, le domaine d'étude sur les vésicules extracellulaires a connu un intérêt grandissant accompagné d'un panel d'applications élargi de jour en jour. Le nombre de publications est en évolution constante, avec à un besoin croissant de standardisation de l'isolement, de la caractérisation mais aussi de l'utilisation fonctionnelle de ces nanoparticules.

Les vésicules extracellulaires dérivées de microglies sont devenues l'objet de recherches intensives visant à élucider leurs rôles dans la consolidation ou l'élagage synaptique, dans la modulation de la réponse astrocytaire, ainsi que dans l'instruction des stimuli inflammatoires par les cellules voisines. De même, des progrès ont été accomplis pour comprendre comment les VEs de différentes sources peuvent affecter et réguler la fonction microgliale, en modifiant leur profil inflammatoire et/ou leur capacité du maintien de l'homéostasie nerveuse en éliminant, par exemple des protéines agrégées toxiques. Dans le contexte particulier de la neurodégénérescence, les VEs dérivées de la microglie suscitent un vif intérêt en raison de leurs rôles multiples et controversés. Si, d'une part, les VEs libérées par la microglie se sont révélées essentiels à la propagation des protéinopathies, plusieurs rapports soulignent leur contribution bénéfique à l'élimination des agrégats de protéines et à la régulation de la fonction neuronale.

Le projet de thèse présenté dans ce manuscrit s'intègre dans la thématique de recherche de notre équipe qui travaille à la caractérisation de cellules microgliales de sangsue et à l'étude de leur activation à la suite d'une lésion expérimentale. Cette approche comporte l'apparition de nanostructures sur le site de la lésion, initialement interprétées comme des artefacts expérimentaux. En effet, ce qu'on pensait être des « poussières » pouvait être des particules biologiquement actives, d'où l'intérêt d'un travail de recherche ciblé sur leur isolement et leur caractérisation morphologique et protéomique.

Nous avons pu montrer par la combinaison de plusieurs techniques que les cellules microgliales de sangsue avaient la capacité de sécréter des vésicules extracellulaires. Nous avons comparé deux techniques d'isolement des VEs, l'ultracentrifugation seule (culot-UC) et l'isolement en gradient d'Optiprep™ (ODG), afin de déterminer la méthode qui induit la présence de moins de contaminants possibles dans le culot vésiculaire.

Les deux techniques conduisent à l'isolement des VEs dont la taille va de 50 à 200 nm. Cependant, l'isolement par ODG a montré une meilleure efficacité quand au rendement et à la qualité du cargo protéique analysé. En effet, de part la comparaison avec le top 100 des

protéines retrouvées dans les vésicules et répertoriées dans ExoCarta, la signature vésiculaire a été augmentée au moins d'un facteur 2 par rapport au culot-UC. Il est également intéressant de voir que les vésicules microgliales de sangsue présentent un cargo protéique assez similaire à ce qui a pu être identifiée chez les mammifères.

Les résultats obtenus lors de l'analyse de l'interactome du cargo protéique des VEs des cellules microgliales de sangsue suggèrent l'implication de ces vésicules dans un contexte de neuroprotection, notamment pour le guidage axonal et l'induction de la repousse neuritique. Il est intéressant de voir que les tests fonctionnels ont confirmé cet effet de manière assez robuste sur les neurones de sangsue, reflétant ce rôle et cette voie de communication entre les cellules microgliales et les neurones.

Après ces premières découvertes sur les vésicules extracellulaires microgliales de sangsue, plusieurs perspectives de travail sont envisageables et on peut les séparer en deux voies d'études exploitables.

La première est plutôt axée sur la compréhension des mécanismes qui régulent l'internalisation des vésicules extracellulaires microgliales. Cette étude pourrait être basée sur le couplage d'une protéine vésiculaire marquée à la GFP exprimée de manière stable dans les VEs secrétées et le suivi du signal GFP dans les neurones. De telles études peuvent être également associées à des expériences d'inhibition compétitive via l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre une protéine d'intérêt. Les vésicules ainsi traitées seront ajoutées à la culture neuronale et suivies pour voir l'effet de telle inhibition sur l'induction de la croissance neuritique ou sur d'autres changements cellulaires.

Pour la deuxième voie il serait intéressant de voir à quel degré le cargo protéique vésiculaire intervient dans l'induction de la croissance neuritique. Dans ce cadre, il faudra orienter la réponse microgliale *in vitro* en fonction des stimuli utilisés et revenir sur l'ATP pour définir par exemple la cinétique de libération des VEs. Utiliser des facteurs pro-inflammatoires ou des facteurs chimioattractants déjà caractérisés chez la sangsue comme l'IL16, l'EMAP2 ou le C1Q. Cela permettrait de faire varier le cargo vésiculaire et déterminer quelle sous population vésiculaire induit le meilleur effet sur l'induction de la croissance neuritique. Il serait également intéressant d'analyser le milieu conditionné des cellules réceptrices afin de rechercher d'éventuels changements dans le profil protéique de leur sécrétome, avant et après l'internalisation des vésicules. Ce contenu différentiel aiderait à identifier la réponse de la cellule réceptrice en termes de facteurs secrétés suite à la stimulation vésiculaire. Une telle

étude peut aussi être menée sur des composants vésiculaires autres que les protéines. En effet, les acides nucléiques type miRNA empaquetées dans les vésicules microgliales de sangsue font l'objet d'un travail de thèse actuellement mené au laboratoire.

Il est possible d'imaginer d'autres moyens de tester l'effet vésiculaire autrement que par la mesure de la croissance neuritique. Dans un contexte neuronal, il serait intéressant de voir l'effet des vésicules sur l'induction des reconnections synaptiques. Cela pourrait être déterminé par des techniques d'électrophysiologie et enregistrement de signal ou par des logiciels dédiés qui ont fait leurs preuves comme le plugin sholl dans imageJ qui détermine le nombre de reconnections dans un réseau neuritique [316]. Des outils de biologie moléculaire comme la PCR quantitative peuvent aussi apporter de réponses intéressantes pour l'étude de la modulation génique dans la cellule cible, avant et après stimulation. Des molécules candidates d'intérêt, connues pour être impliquées dans les mécanismes de réparation comme la BDNF pourraient être suivies en PCR quantitative pour voir l'évolution de leur expression en fonction du traitement en présence de vésicules.

Ces perspectives peuvent être appliquées en parallèle sur les neurones de sangsue et sur des neurones de mammifères (modèle murin et/ou humain) dans une dynamique translationnelle inter-espèces. En outre, nous avons montré dans cette étude que les cellules microgliales de sangsue sécrètent une grande quantité de VEs. En effet 5 millilitres de milieu conditionné suffisaient pour mener à bien les expérimentations. Le modèle sangsue, reste très attrayant quant à la facilité d'isolement et de séparation des populations cellulaires. D'un point de vue accessibilité et éthique, le fait d'être sur un modèle annélide décomplexifie très largement les processus d'obtention et d'utilisation des animaux. De plus, la conservation de la nature du cargo protéique analysé, suggère fortement une conservation au niveau fonctionnel et mécanismes d'actions.

L'avantage des études sur les vésicules extracellulaires est l'énorme étendue des applications possibles du fait de leur présence dans la plupart des types cellulaires et fluides biologiques. Les avancées sur les techniques d'isolement et la manipulation de leur composition évoluent rapidement. Jusqu'à là beaucoup de découvertes pertinentes ont déjà vu le jour et tout porte à croire que ce n'est qu'un commencement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18:225–42.
- [2] Tremblay M-È, Lecours C, Samson L, et al. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front Neuroanat* 2015;9:45.
- [3] García-Marín V, García-López P, Freire M. Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci* 2007;30:479–87.
- [4] Paolicelli RC, Bergamini G, Rajendran L. Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience* 2018;PMID: 29660443.
- [5] Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-) 2010;330:841–5.
- [6] Bruttger J, Karram K, Wörtge S, et al. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* 2015;43:92–107.
- [7] Nimmerjahn, Kirchhoff H. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* (80-) 2005;308:1310–4.
- [8] Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013;155:1596–609.
- [9] Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* (80-) 2011;333:1456–8.
- [10] Paolicelli RC, Ferretti MT. Function and dysfunction of microglia during brain development: Consequences for synapses and neural circuits. *Front Synaptic Neurosci* 2017;9:9.
- [11] Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett* 2011;585:3798–805.
- [12] Ngu EM, Sahley CL, Muller KJ. Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. *J Comp Neurol* 2007;503:101–9.
- [13] Masuda-Nakagawa LM, Walz A, Brodbeck D, et al. Substrate-dependent interactions of leech microglial cells and neurons in culture. *J Neurobiol* 1994;25:83–91.
- [14] Orchard I, Webb RA. The projections of neurosecretory cells in the brain of the North-American medicinal leech, *Macrobdella decora*, using intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Neurobiol* 1980;11:229–42.
- [15] Yau K-W. Physiological properties and receptive fields of mechanosensory neurones in the head ganglion of the leech: comparison with homologous cells in segmental ganglia. vol. 263. 1976.
- [16] Le Marrec-Croq F, Drago F, Vizioli J, et al. The leech nervous system: A valuable model to study the microglia involvement in regenerative processes. *Clin Dev Immunol*

- 2013;2013:274019.
- [17] Nicholls JG, Baylor DA. Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech . Specific Modalities and Receptive Fields of Sensory Neurons in CNS of the Leech. *J Neurophysiol* 1968;31:740–56.
 - [18] Stuart AE. Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech. *J Physiol* 1970;209:627–46.
 - [19] Jahnsen JKS, Nicholls JG. Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proc Natl Acad Sci* 1972;69:639–639.
 - [20] Elliot EJ MK. Synapses between neurons regenerate accurately after destruction of ensheathing glial cells in the leech. *Science* (80-) 1982;5:1260–2.
 - [21] Tahtouh M, Croq F, Vizioli J, et al. Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. *Mol Immunol* 2009;46:523–31.
 - [22] Drago F, Sautière PE, Le Marrec-Croq F, et al. Microglia of medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) express a specific activation marker homologous to vertebrate ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1/alias aif-1). *Dev Neurobiol* 2014;74:987–1001.
 - [23] Duan Y, Sahley CL, Muller KJ. ATP and NO dually control migration of microglia to nerve lesions. *Dev Neurobiol* 2009;69:60–72.
 - [24] Samuels SE, Lipitz JB, Dahl G, et al. Neuroglial ATP release through innexin channels controls microglial cell movement to a nerve injury. *J Gen Physiol* 2010;136:425–42.
 - [25] Chen A, Kumar SM, Sahley CL, et al. Nitric Oxide Influences Injury-Induced Microglial Migration and Accumulation in the Leech CNS. *J Neurosci* 2000;20:1036–43.
 - [26] Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Boidin-Wichlacz C, et al. Deciphering the Immune Function and Regulation by a TLR of the Cytokine EMAPII in the Lesioned Central Nervous System Using a Leech Model. *J Immunol* 2009;183:7119–28.
 - [27] Croq F, Vizioli J, Tuzova M, et al. A homologous form of human interleukin 16 is implicated in microglia recruitment following nervous system injury in leech *Hirudo medicinalis*. *Glia* 2010;58:1649–62.
 - [28] Lefebvre C. Calreticulin contributes to C1q-dependent recruitment of microglia in the leech *Hirudo medicinalis* following a CNS injury. *Med Sci Monit* 2014;20:644–53.
 - [29] Schluesener HJ, Seid K, Meyermann R. Effects of autoantigen and dexamethasone treatment on expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II and allograft-inflammatory factor-1 by activated macrophages and microglial cells in lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 1999;97:119–26.
 - [30] Cuvillier-Hot V, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, et al. Characterization and immune function of two intracellular sensors, HmTLR1 and HmNLR, in the injured CNS of an invertebrate. *Dev Comp Immunol* 2011;35:214–26.
 - [31] Center DM, Cruikshank W. Modulation of lymphocyte migration by human

- lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J Immunol* 1982;128:2563–8.
- [32] Schluesener HJ, Seid K, Kretzschmar J, et al. Leukocyte chemotactic factor, a natural ligand to CD4, is expressed by lymphocytes and microglial cells of the MS plaque. *J Neurosci Res* 1996;44:606–11.
- [33] Bergamaschini L, Donarini C, Gobbo G, et al. Activation of complement and contact system in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1971–83.
- [34] Färber K, Cheung G, Mitchell D, et al. C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. *J Neurosci Res* 2009;87:644–52.
- [35] Tahtouh M, Garçon-Bocquet A, Croq F, et al. Interaction of HmC1q with leech microglial cells: Involvement of C1qBP-related molecule in the induction of cell chemotaxis. *J Neuroinflammation* 2012;9:1–14.
- [36] Kong M, Alvarez A, Valdivia A, et al. GLIA Bilbao 2015: Abstracts Oral Presentations, Posters, Indexes. *Glia*, vol. 63, 2015, p. E76–E469 (T08–19A, T12–13A).
- [37] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654–9.
- [38] Basso M, Bonetto V. Extracellular vesicles and a novel form of communication in the brain. *Front Neurosci* 2016;10:1–13.
- [39] Turola E, Furlan R, Bianco F, et al. Microglial microvesicle secretion and intercellular signaling. *Front Physiol* 2012;3:20129.
- [40] Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* 1967;13:269–88.
- [41] Dalton AJ. Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus like” particles. *J Natl Cancer Inst* 1975;54:1137–48.
- [42] Trams EG, Lauter CJ, Salem N, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Nature* 1932;130:63–70.
- [43] Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983;97:329–39.
- [44] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* 1983;33:967–78.
- [45] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987;262:9412–20.
- [46] Raposo G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183:1161–72.
- [47] Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998;4:594–600.

Bibliographie

- [48] Thery C, Boussac M, Veron P, et al. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J Immunol* 2001;166:7309–18.
- [49] Théry C, Duban L, Segura E, et al. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 2002;3:1156–62.
- [50] Araldi E, Krämer-Albers E-M, Hoen EN-'t, et al. International Society for Extracellular Vesicles: first annual meeting, April 17-21, 2012: ISEV-2012. *J Extracell Vesicles* 2012;1:19995.
- [51] Gould SJ, Raposo G. As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2013;2:20389.
- [52] Brody I, Ronquist G, Gottfries A. Ultrastructural localization of the prostasome - an organelle in human seminal plasma. *Ups J Med Sci* 1983;88:63–80.
- [53] Ronquist G, Brody I. The prostasome: its secretion and function in man. *BBA - Rev Biomembr* 1985;822:203–18.
- [54] Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, et al. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol* 2012;181:1573–84.
- [55] Meehan B, Rak J, Vizio D Di. Oncosomes - large and small: What are they, where they came from? *J Extracell Vesicles* 2016;5:33109.
- [56] Vlassov A V, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2012;1820:940–8.
- [57] György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2667–88.
- [58] Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol* 2015;25:364–72.
- [59] Hugel B. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology* 2005;20:22–7.
- [60] Mause SF, Weber C. Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010;107:1047–57.
- [61] Lötval J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014;3:26913.
- [62] Witwer KW, Soekmadji C, Hill AF, et al. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *J Extracell Vesicles* 2017;6:1396823.
- [63] E. Van der Pol ANB, EL. Gool RN. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 2016;14:48–56.
- [64] Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to

- characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:E968–77.
- [65] Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29:116–25.
 - [66] van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev Cell* 2011;21:708–21.
 - [67] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;Chapter 3:1–29.
 - [68] Blanc L, Vidal M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases* 2018;9:95–106.
 - [69] Scott CC, Vacca F, Gruenberg J. Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* 2014;31:2–10.
 - [70] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010;12:19–30.
 - [71] Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012;14:677–85.
 - [72] Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:4–11.
 - [73] Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, et al. The Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 2002;4:534–9.
 - [74] Katzmman DJ, Stefan CJ, Babst M, et al. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 2003;162:413–23.
 - [75] Katzmman DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 2001;106:145–55.
 - [76] Babst M, Katzmman DJ, Snyder WB, et al. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 2002;3:283–9.
 - [77] Babst M, Katzmman DJ, Estepa-Sabal EJ, et al. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev Cell* 2002;3:271–82.
 - [78] Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J* 2015;34:2398–407.
 - [79] Buschow SI, Liefhebber JMP, Wubbolts R, et al. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells, Mol Dis* 2005;35:398–403.
 - [80] Hasegawa T, Konno M, Baba T, et al. The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein. *PLoS One* 2011;6:29460.
 - [81] Saksena S, Wahlman J, Teis D, et al. Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly

- and Disassembly. *Cell* 2009;136:97–109.
- [82] Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, et al. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 2009;10:925–37.
 - [83] Géminard C, de Gassart A, Blanc L, et al. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TfR for sorting in exosomes. *Traffic* 2004;5:181–93.
 - [84] Hurley JH, Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* 2012;14:654–5.
 - [85] Vingtdeux V, Sergeant N, Buée L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. *Front Physiol* 2012;3:1–16.
 - [86] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* (80-) 2008;319:1241–4.
 - [87] Miranda AM, Lasiecka ZM, Xu Y, et al. Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nat Commun* 2018;9.
 - [88] Ju R, Zhuang ZW, Zhang J, et al. Angiopoietin-2 secretion by endothelial cell exosomes: Regulation by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and syndecan-4/syntenin pathways. *J Biol Chem* 2014;289:510–9.
 - [89] Hessvik NP, Øverbye A, Brech A, et al. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:4717–37.
 - [90] Young LN, Cho K, Lawrence R, et al. Dynamics and architecture of the NRBF2-containing phosphatidylinositol 3-kinase complex I of autophagy. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:8224–9.
 - [91] Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: Coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front Immunol* 2014;5:1–6.
 - [92] Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:801–11.
 - [93] Buschow SI, Nolte-'t Hoen ENM, van Niel G, et al. MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 2009;10:1528–42.
 - [94] Edgar JR, Eden ER, Futter CE. Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic* 2014;15:197–211.
 - [95] Verweij FJ, Van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, et al. LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-κB activation. *EMBO J* 2011;30:2115–29.
 - [96] Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, et al. Exosome release of β-catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 2010;190:1079–91.
 - [97] Tejera E, Rocha-Perugini V, Lopez-Martin S, et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell* 2013;24:261–73.

Bibliographie

- [98] Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012;151:1542–56.
- [99] Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, et al. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 1983;96:1–27.
- [100] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* (80-) 2004;306:990–5.
- [101] Eitan E, Suire C, Zhang S, et al. Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Res Rev* 2016;32:65–74.
- [102] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:107–17.
- [103] van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:213–28.
- [104] Rocha N, Kuijl C, Van Der Kant R, et al. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* 2009;185:1209–25.
- [105] Song P, Trajkovic K, Tsunemi T, et al. Parkin Modulates Endosomal Organization and Function of the Endo-Lysosomal Pathway. *J Neurosci* 2016;36:2425–37.
- [106] Möbius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, et al. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 2003;4:222–31.
- [107] Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:13010–5.
- [108] Fader CM, Savina A, Sánchez D, et al. Exosome secretion and red cell maturation: Exploring molecular components involved in the docking and fusion of multivesicular bodies in K562 cells. *Blood Cells, Mol Dis* 2005;35:153–7.
- [109] Savina A, Fader CM, Damiani MT, et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 2005;6:131–43.
- [110] Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 2002;115:2505–15.
- [111] Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, et al. Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication. *PLoS Biol* 2013;11:1001604.
- [112] Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura SI, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 2010;189:223–32.
- [113] Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* 2011;124:447–58.
- [114] Weber T, Zemelman B V, McNew JA, et al. The v- and t-SNAREs bind each other in a pairwise, cognate fashion. *Cell* 1998;92:759–72.

- [115] Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2005;1744:120–44.
- [116] Li Y, Augustine GJ, Weninger K. Kinetics of complexin binding to the SNARE complex: Correcting single molecule FRET measurements for hidden events. *Biophys J* 2007;93:2178–87.
- [117] Jahn R, Scheller RH. SNAREs - Engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:631–43.
- [118] Bonifacino JS, Glick BS. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* 2004;116:153–66.
- [119] Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, et al. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:15781–6.
- [120] Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, et al. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 1993;75:409–18.
- [121] Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB, et al. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2009;1793:1901–16.
- [122] Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 2012;14:1036–45.
- [123] Koles K, Nunnari J, Korkut C, et al. Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *J Biol Chem* 2012;287:16820–34.
- [124] Wei Y, Wang D, Jin F, et al. Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nat Commun* 2017;8:1–12.
- [125] Verweij FJ, Bebelman MP, Jimenez CR, et al. Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *J Cell Biol* 2018;217:1129–42.
- [126] Kuang Hu, Joe Carroll, Sergei Fedorovich CR, Davletov AS& B. Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion. *Nature* 2002;415:646–50.
- [127] Südhof TC. Synaptotagmins: Why so many? *J Biol Chem* 2002;277:7629–32.
- [128] Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes. *Curr Biol* 2011;21:R940–1.
- [129] Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, et al. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Curr Biol* 2009;19:1875–85.
- [130] Clancy JW, Sedgwick A, Rosse C, et al. Regulated delivery of molecular cargo to invasive tumour-derived microvesicles. *Nat Commun* 2015;6:6919.
- [131] Balaj L, Lessard R, Dai L, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2011;2:180.

- [132] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009;19:43–51.
- [133] Ratajczak MZ, Ratajczak J. Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med* 2016;5:7.
- [134] D’Souza-Schorey Crislyn C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: Shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev* 2012;26:1287–99.
- [135] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200:373–83.
- [136] Turiák L, Misják P, Szabó TG, et al. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics* 2011;74:2025–33.
- [137] Nabhan JF, Hu R, Oh RS, et al. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:4146–51.
- [138] Wehman AM, Poggioli C, Schweinsberg P, et al. Article The P4-ATPase TAT-5 Inhibits the Budding of Extracellular Vesicles in *C. elegans* Embryos. *Curr Biol* 2011;21:1951–9.
- [139] Record M, Silvente-Poirot S, Poirot M, et al. Extracellular vesicles : lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res* 2018;59:1316–24.
- [140] Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Remodelage de la membrane plasmique et stimulation cellulaire. *Medecine/Sciences* 2004;20:189–95.
- [141] Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DWC, et al. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1999;1439:317–30.
- [142] Pasquet JM, Dachary-Prigent J, Nurden AT. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem* 1996;239:647–54.
- [143] Stachowiak JC, Schmid EM, Ryan CJ, et al. Membrane bending by protein-protein crowding. *Nat Cell Biol* 2012;14:944–9.
- [144] Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24641.
- [145] Chivet M, Javalet C, Laulagnier K, et al. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24722.
- [146] Prada I, Amin L, Furlan R, et al. A new approach to follow a single extracellular vesicle–cell interaction using optical tweezers. *Biotechniques* 2016;60:35–41.
- [147] Krämer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics - Clin Appl* 2007;1:1446–61.

- [148] Tian T, Wang Y, Wang H, et al. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* 2010;111:488–96.
- [149] Akers JC, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 2013;113:1–11.
- [150] Raposo G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183:1161–72.
- [151] Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, et al. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:17380–5.
- [152] Rana S, Yue S, Stadel D, et al. Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1574–84.
- [153] Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, et al. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998;273:20121–7.
- [154] Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 2004;104:3257–66.
- [155] Nazarenko I, Rana S, Baumann A, et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 2010;70:1668–78.
- [156] Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009;78:857–902.
- [157] Escrevente C, Keller S, Altevogt P, et al. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2011;11:108.
- [158] Kirchhausen T. Clathrin. *Annu Rev Biochem* 2000;699–727.
- [159] Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 2003;161:673–7.
- [160] Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:46–54.
- [161] Falcone S, Cocucci E, Podini P, et al. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci* 2006;119:4758–69.
- [162] Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic* 2009;10:364–71.
- [163] Feng D, Zhao WL, Ye YY, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 2010;11:675–87.
- [164] Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:639–49.
- [165] Stephens L, Ellison C, Hawkins P. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:203–13.

- [166] Fomina AF, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. Regulation of membrane trafficking and subcellular organization of endocytic compartments revealed with FM1-43 in resting and activated human T cells. *Exp Cell Res* 2003;291:150–66.
- [167] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207–16.
- [168] Miyanishi M, Tada K, Koike M, et al. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 2007;450:435–9.
- [169] Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, et al. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. *J Biol Chem* 2012;287:10977–89.
- [170] Nolte-'t Hoen ENM, Buschow SI, Anderton SM, et al. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Immunobiology* 2009;113:1977–81.
- [171] Wang LH, Rothberg KG, Anderson RGW. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 1993;123:1107–17.
- [172] Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., Dautry-Varsat A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci* 1999;112:1303–11.
- [173] Tian T, Zhu YL, Zhou YY, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem* 2014;289:22258–67.
- [174] Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA, et al. Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J Cell Biol* 1993;122:565–78.
- [175] Marks B, Stowell MHB, Vallis Y, et al. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 2001;410:231–5.
- [176] Chappie JS, Acharya S, Leonard M, et al. G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 2010;465:435–40.
- [177] van Dongen HM, Masoumi N, Witwer KW, et al. Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016;80:369–86.
- [178] Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, et al. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem* 2013;288:17713–24.
- [179] Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, et al. Exosomes Derived from Epstein-Barr Virus-Infected Cells Are Internalized via Caveola-Dependent Endocytosis and Promote Phenotypic Modulation in Target Cells. *J Virol* 2013;87:10334–47.
- [180] Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 2002;110:597–603.
- [181] Frick M, Bright NA, Riento K, et al. Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding. *Curr Biol* 2007;17:1151–6.

- [182] Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012;119:756–66.
- [183] Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, et al. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS One* 2011;6:24234.
- [184] Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009;284:34211–22.
- [185] Chernomordik L V., Kozlov MM. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:675–83.
- [186] Dascher C, Ossig R, Gallwitz D, et al. Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily. *Mol Cell Biol* 1991;11:872–85.
- [187] Jahn R, Südhof TC. Membrane Fusion and Exocytosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:863–911.
- [188] Rizo J, Chen X, Araç D. Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol* 2006;16:339–50.
- [189] Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science* (80-) 2009;323:474–7.
- [190] Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, et al. Synaptic Assembly of the Brain in the Absence of Neurotransmitter Secretion. *Science* (80-) 2000;287:864–869.
- [191] Gardiner C, Vizio D Di, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles* 2016;5:32945.
- [192] Kalra H, Simpson RJ, Ji H, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol* 2012;10:e1001450.
- [193] Kim DK, Kang B, Kim OY, et al. EVpedia: An integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2013;2:20384.
- [194] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 2016;428:688–92.
- [195] Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids. *Mol Cell Proteomics* 2013;12:587–98.
- [196] Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 2013;126:5553–65.
- [197] Kormelink TG, Arkesteijn GJA, Nauwelaers FA, et al. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytom Part A* 2016;89:135–47.
- [198] Whitehead CA, Luwor RB, Morokoff AP, et al. Cancer exosomes in cerebrospinal fluid.

- Transl Cancer Res 2017;6:S1352–70.
- [199] Choi DS, Kim DK, Kim YK, et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 2013;13:1554–71.
 - [200] Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015;4:1–60.
 - [201] Record M, Carayon K, Poirot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2014;1841:108–20.
 - [202] Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, et al. Exosome mimetics: A novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1525–41.
 - [203] Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:1–17.
 - [204] Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005;106:1604–11.
 - [205] Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles* 2013;2:20677.
 - [206] Li L, Zhu D, Huang L, et al. Argonaute 2 Complexes Selectively Protect the Circulating MicroRNAs in Cell-Secreted Microvesicles. *PLoS One* 2012;7:e46957.
 - [207] Shelke GV, Lässer C, Gho YS, et al. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24783.
 - [208] Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20:847–56.
 - [209] Nolte T, Hoen ENM, Buermans HPJ, Waasdorp M, et al. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012;40:9272–85.
 - [210] Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231–5.
 - [211] Gan J, Qu Y, Li J, et al. An evaluation of the links between microRNA, autophagy, and epilepsy. *Rev Neurosci* 2015;26:225–37.
 - [212] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005;436:740–4.
 - [213] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:5003–8.
 - [214] de Candia P, Torri A, Gorletta T, et al. Intracellular Modulation, Extracellular Disposal

- and Serum Increase of MiR-150 Mark Lymphocyte Activation. *PLoS One* 2013;8:75348.
- [215] Ostenfeld MS, Jeppesen DK, Laurberg JR, et al. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res* 2014;74:5758–71.
- [216] Russo F, Di Bella S, Nigita G, et al. miRandola: Extracellular Circulating MicroRNAs Database. *PLoS One* 2012;7:e47786.
- [217] Holmgren L, Bergsmedh A, Spetz AL. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Vox Sang* 2002;83 Suppl 1:305–6.
- [218] Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, et al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001;3:339–45.
- [219] Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res* 2010;316:1977–84.
- [220] Waldenström A, Genneback N, Hellman U, et al. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* 2012;7.
- [221] Guescini M, Genedani S, Stocchi V, et al. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm* 2010;117:1–4.
- [222] Cai J, Wu G, Jose PA, et al. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Exp Cell Res* 2016;349:179–83.
- [223] Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24858.
- [224] Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* 2012;82:1024–32.
- [225] Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* 2014;3:23430.
- [226] Kreimer S, Ivanov AR. Rapid Isolation of Extracellular Vesicles from Blood Plasma with Size-Exclusion Chromatography Followed by Mass Spectrometry-Based Proteomic Profiling. *Methods Mol Biol* 2017;1660:295–302.
- [227] Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep* 2016;6:24316.
- [228] Rho J, Chung J, Im H, et al. Magnetic nanosensor for detection and profiling of erythrocyte-derived microvesicles. *ACS Nano* 2013;7:11227–33.
- [229] Wunsch BH, Smith JT, Gifford SM, et al. Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20nm. *Nat Nanotechnol* 2016;11:936–40.
- [230] Chen C, Skog J, Hsu CH, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of

- serum microvesicles. *Lab Chip* 2010;10:505–11.
- [231] Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, et al. A Microfluidic ExoSearch Chip for Multiplexed Exosome Detection Towards Blood-based Ovarian Cancer Diagnosis †. *Lab Chip* 2016;489–96.
- [232] Lee K, Shao H, Weissleder R, et al. Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano* 2015;9:2321–7.
- [233] Shao H, Im H, Castro CM, et al. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev* 2018;118:1917–50.
- [234] Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011;87:146–50.
- [235] Street JM, Barran PE, Mackay CL, et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med* 2012;10.
- [236] Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res* 2017;120:1632–48.
- [237] Yuana Y, Koning RI, Kuil ME, et al. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles* 2013;2:21494.
- [238] Tatischeff I, Larquet E, Falcón-Pérez JM, et al. Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *J Extracell Vesicles* 2012;1:19179.
- [239] van Niel G, Bergam P, Di Cicco A, et al. Apolipoprotein E Regulates Amyloid Formation within Endosomes of Pigment Cells. *Cell Rep* 2015;13:43–51.
- [240] Gilbert PFC. The Reconstruction of a Three-Dimensional Structure from Projections and Its Application to Electron Microscopy. II. Direct Methods. *Proc R Soc B Biol Sci* 1972;182:89–102.
- [241] Ercius P, Alaidi O, Rames MJ, et al. Electron Tomography: A Three-Dimensional Analytic Tool for Hard and Soft Materials Research. *Adv Mater* 2015;27:5638–63.
- [242] Sharma S, Rasool HI, Palanisamy V, et al. Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM, and force spectroscopy. *ACS Nano* 2010;4:1921–6.
- [243] Gardiner C, Ferreira YJ, Dragovic RA, et al. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *J Extracell Vesicles* 2013;2:19671.
- [244] Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2011;7:780–8.
- [245] Coumans FAW, van der Pol E, Böing AN, et al. Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing. *J Extracell Vesicles* 2014;3:25922.
- [246] Akers JC, Ramakrishnan V, Nolan JP, et al. Comparative analysis of technologies for

- quantifying extracellular vesicles (EVs) in clinical cerebrospinal fluids (CSF). PLoS One 2016;11:e0149866.
- [247] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles* 2015;4:27031.
- [248] Bio-Rad Laboratories. ELISA Basics Guide. Available at: <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/an-introduction-to-elisa/elisa-basics-guide.pdf>. Accessed October 24, 2018.
- [249] Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, et al. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep* 2014;4:06232.
- [250] Kreimer S, Belov AM, Ghiran I, et al. Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: Lipidomics and proteomics. *J Proteome Res* 2015;14:2367–84.
- [251] Choi DS, Choi DY, Hong BS, et al. Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *J Extracell Vesicles* 2012;1:18704.
- [252] Dong-Sic Choi, Dae-Kyum Kim, Yoon-Keun Kim and YSG. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev* 2015;34:474–90.
- [253] Choi DS, Yang JS, Choi EJ, et al. The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res* 2012;11:1144–51.
- [254] Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytom Part A* 2010;77:502–14.
- [255] Arraud N, Gounou C, Turpin D, et al. Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytom Part A* 2016;89:184–95.
- [256] Van Der Pol E, Van Gemert MJC, Sturk A, et al. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost* 2012;10:919–30.
- [257] Aass HCD, Øvstebø R, Trøseid AMS, et al. Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis. *Cytom Part A* 2011;79 A:990–9.
- [258] Larson MC, Luthi MR, Hogg N, et al. Calcium-phosphate microprecipitates mimic microparticles when examined with flow cytometry. *Cytom Part A* 2013;83 A:242–50.
- [259] Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep* 2011;3:15.
- [260] Kondo K. Rising Prevalence of Neurodegenerative Diseases Worldwide. *J Intern Med* 1996;35:238.
- [261] Coleman BM, Hill AF. Extracellular vesicles - Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2015;40:89–96.
- [262] Rajendran L, Bali J, Barr MM, et al. Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the

- Nervous System. *J Neurosci* 2014;34:15482–9.
- [263] Spires-Jones TL, Hyman BT. The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. *Neuron* 2014;82:756–71.
- [264] Zhang H, Ma Q, Zhang YW, et al. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem* 2012;120:9–21.
- [265] Haass C, Kaether C, Thinakaran G, et al. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006270.
- [266] Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes 2006;103:11172–11177.
- [267] Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, et al. Ectosomes: A new mechanism for non-exosomal secretion of Tau protein. *PLoS One* 2014;9:e100760.
- [268] Frühbeis C, Fröhlich D, Krämer-Albers EM. Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front Physiol* 2012;3 APR:1–7.
- [269] Verderio C, Muzio L, Turola E, et al. Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann Neurol* 2012;72:610–24.
- [270] Prada I, Gabrielli M, Turola E, et al. Glia-to-neuron transfer of miRNAs via extracellular vesicles: a new mechanism underlying inflammation-induced synaptic alterations. *Acta Neuropathol* 2018;135:529–50.
- [271] Prada I, Amin L, Furlan R, et al. A new approach to follow a single extracellular vesicle–cell interaction using optical tweezers. *Biotechniques* 2016;60:35–41.
- [272] Antonucci F, Turola E, Riganti L, et al. Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J* 2012;31:1231–40.
- [273] Potolicchio I, Carven GJ, Xu X, et al. Proteomic Analysis of Microglia-Derived Exosomes: Metabolic Role of the Aminopeptidase CD13 in Neuropeptide Catabolism. *J Immunol* 2005;175:2237–43.
- [274] Turola E, Furlan R, Bianco F, et al. Microglial microvesicle secretion and intercellular signaling. *Front Physiol* 2012;3:20129.
- [275] Raymond AD, Diaz P, Chevelon S, et al. Microglia-derived HIV Nef+ exosome impairment of the blood–brain barrier is treatable by nanomedicine-based delivery of Nef peptides. *J Neurovirol* 2016;22:129–39.
- [276] Takenouchi T, Tsukimoto M, Iwamaru Y, et al. Extracellular ATP induces unconventional release of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from microglial cells. *Immunol Lett* 2015;167:116–24.
- [277] Kumar A, Stoica BA, Loane DJ, et al. Microglial-derived microparticles mediate neuroinflammation after traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2017;14:14:47.
- [278] Huang S, Ge X, Yu J, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB J* 2016:236–44.

- [279] Fauré J, Lachenal G, Court M, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 2006;31:642–8.
- [280] Bahrini I, Song JH, Diez D, et al. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep* 2015;5:7989.
- [281] Krämer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics - Clin Appl* 2007;1:1446–61.
- [282] Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, et al. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci* 2013;7:182.
- [283] De Vrij J, Niek Maas SL, Kwappenberg KMC, et al. Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int J Cancer* 2015;137:1630–42.
- [284] Li JJ, Wang B, Kodali MC, et al. In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2018;15.
- [285] Casano AM, Peri F. Microglia: Multitasking Specialists of the Brain. *Dev Cell* 2015;32:469–77.
- [286] Kierdorf K, Prinz M. Microglia in steady state Katrin. *J Clin Invest* 2017;127:3201–9.
- [287] Jahnsen JKS, Nicholls JG. Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proc Natl Acad Sci* 1972;69:639–639.
- [288] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:255–89.
- [289] Budnik V, Ruiz-Cañada C, Wendler F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2016;17:160–72.
- [290] Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res* 2017;66:30–41.
- [291] Cvjetkovic A, Jang SC, Konečná B, et al. Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles– Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation 2016.
- [292] Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:575–81.
- [293] Graham JM. OptiPrep density gradient solutions for mammalian organelles. *ScientificWorldJournal* 2002;2:1440–3.
- [294] Macagno ER, Gaasterland T, Edsall L, et al. Construction of a medicinal leech transcriptome database and its application to the identification of leech homologs of neural and innate immune genes. *BMC Genomics* 2010;11.
- [295] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, et al. UniProtKB/Swiss-Prot. *Methods Mol Biol* 2007;406:89–112.

- [296] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [297] Lab L. In-gel digestion of proteins separated by SDS-PAGE. Available at: [http://www.lamondlab.com/newwebsite/Protocols for Website/In-gel digestion.pdf](http://www.lamondlab.com/newwebsite/Protocols%20for%20Website/In-gel%20digestion.pdf). Accessed July 19, 2018.
- [298] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008;26:1367–72.
- [299] Urgen Cox J, Neuhauser N, Michalski A, et al. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res* 2011;10:1794–805.
- [300] Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016;13:731–40.
- [301] Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* 2015;15:2597–601.
- [302] Calabrese EJ. Enhancing and regulating neurite outgrowth. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:391–418.
- [303] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2019;8:1535750.
- [304] Roy S, Hochberg FH, Jones PS. Extracellular vesicles: the growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *J Extracell Vesicles* 2018;7.
- [305] Paolini L, Zendrini A, Noto G Di, et al. Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity. *Sci Rep* 2016;6:23550.
- [306] Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, et al. Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci Rep* 2016;6:33641.
- [307] Sun Y, Huo C, Qiao Z, et al. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. *J Proteome Res* 2018;17:1101–7.
- [308] Rezeli M, Gidlöf O, Evander M, et al. Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Isolated by Acoustic Trapping or Differential Centrifugation. *Anal Chem* 2016;88:8577–86.
- [309] Ribeiro KS, Vasconcellos CI, Soares RP, et al. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *J Extracell Vesicles* 2018;7.
- [310] Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013;2:1–25.
- [311] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of

- Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:255–89.
- [312] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003;422:198–207.
- [313] Xu Y, Bolton B, Zipser B, et al. Gliarin and macrolin, two novel intermediate filament proteins specifically expressed in sets and subsets of glial cells in leech central nervous system. *J Neurobiol* 1999;40:244–53.
- [314] Vergote D, Sautière PE, Vandenbulcke F, et al. Up-regulation of neurohemerythrin expression in the central nervous system of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, following septic injury. *J Biol Chem* 2004;279:43828–37.
- [315] Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, et al. Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* 2000;149:889–99.
- [316] B. D, J. P, Y. A, et al. The orthodontist confronted with agenesis of the upper lateral incisors. *Actual Odontostomatol (Paris)* 1972;26:483–90.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Dans JEV (*Journal for Extracellular Vesicles*) [303]

Title

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

Authors

Clotilde Théry, Kenneth W Witwer, Elena Aikawa, Maria Jose Alcaraz, Johnathon D Anderson, Ramarosan Andriantsitohaina, Anna Antoniou, Tanina Arab et al.

Abstract

The last decade has seen a sharp increase in the number of scientific publications describing physiological and pathological functions of extracellular vesicles (EVs), a collective term covering various subtypes of cell-released, membranous structures, called exosomes, microvesicles, microparticles, ectosomes, oncosomes, apoptotic bodies, and many other names. However, specific issues arise when working with these entities, whose size and amount often make them difficult to obtain as relatively pure preparations, and to characterize properly. The International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) proposed Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (“MISEV”) guidelines for the field in 2014. We now update these “MISEV2014” guidelines based on evolution of the collective knowledge in the last four years. An important point to consider is that ascribing a specific function to EVs in general, or to subtypes of EVs, requires reporting of specific information beyond mere description of function in a crude, potentially contaminated, and heterogeneous preparation. For example, claims that exosomes are endowed with exquisite and specific activities remain difficult to support experimentally, given our still limited knowledge of their specific molecular machineries of biogenesis and release, as compared with other biophysically similar EVs. The MISEV2018 guidelines include tables and outlines of suggested protocols and steps to follow to document specific EV-associated functional activities. Finally, a checklist is provided with summaries of key points.

Keywords

extracellular vesicles; exosomes; ectosomes; microvesicles; minimal information requirements; guidelines; standardization; microparticles; rigor; reproducibility

Dans JEV => en révision

Title

Proteomic characterization of leech microglia extracellular vesicles (EVs): comparison between differential ultracentrifugation and Optiprep™ density gradient isolation.

Authors

T Arab¹, A Raffo-Romero¹, C Van Camp¹, Q Lemaire¹, F Le Marrec-Croq¹, F Drago¹, S Aboulouard¹, C Slomianny^{2,3}, A-S Lacoste³, I Guigon⁴, H. Touzet⁵, M Salzet¹, I Fournier¹, C Lefebvre¹, J Vizioli¹ and P-E Sautière¹

Abstract

In Mammals, microglial cells are considered as the resident immune cells in central nervous system (CNS). Many studies demonstrated that, after injury, these cells are activated and recruited at the lesion site. Leech microglia present a similar pattern of microglial activation and migration upon experimental lesion of CNS. This activation is associated with the release of a large amount of Extracellular Vesicles (EVs).

We collected EVs released by microglia primary culture and compared two different protocols of isolation: one with differential ultracentrifugation and one using an additional Optiprep™ Density Gradient (ODG) ultracentrifugation. Nanoparticles tracking analysis and transmission electron microscopy were used to assess vesicles size and morphology. The protein content of isolated EVs was assessed by mass spectrometry approaches. Results showed the presence of EV-specific proteins in both procedures. The extensive proteomic analysis of each single ODG fractions confirmed the efficiency of this protocol in limiting the presence of co-isolated proteins aggregates and other membranous particles during vesicles isolation. The present study permitted for the first time the characterization of microglial EV protein content in an annelid model. Interestingly, an important amount of proteins found in leech vesicles were previously described in EV-specific databases.

Keywords

Hirudo medicinalis, microglia, extracellular vesicles, protein content, ultracentrifugation, Optiprep™

Dans IJMS (*the International Journal of Molecular Science*) => en révision

Title

Medicinal leech CNS as a model for exosome studies in the crosstalk between microglia and neurons

Authors

Antonella Raffo Romero* 1, Tanina Arab* 1, Issa S. Al-Amri2, Francoise Le Marrec-Croq1, Christelle Van Camp1, Quentin Lemaire1, Michel Salzet1, Jacopo Vizioli1, Pierre-Eric Sautiere§, Christophe Lefebvre§1

* Contributed equally to this work § Supervised equally this work.

Abstract

In healthy or pathological brain, the neuroinflammatory state is supported by a strong communication involving microglia and neurons. Recent studies indicate that extracellular vesicles (EVs), including exosomes and microvesicles, play a key role in the physiological interactions between cells allowing Central Nervous System (CNS) development and/or integrity. The present report used medicinal leech CNS to investigate microglia/neuron crosstalk from ex vivo approaches as well as primary cultures. The results demonstrated a large production of exosomes from activated microglia. Their incubation to primary neuronal cultures showed a strong interaction with neurites. In addition, neurite outgrowth assays demonstrated microglia exosomes to exhibit significant neurotrophic activities using at least a TGF- β family member, called nGDF. Of interest, the results also showed an EV-mediated dialog between leech microglia and rat cells highlighting this communication to be more a matter of molécules than of species. Taken together, the present report brings a new insight into the microglia/neuron crosstalk in CNS and would help deciphering the molecular evolution of such a cell communication in brain.

Keywords

Microglia, Exosomes, Neurite Outgrowth, Leech

Communications Orales

- Annual meeting of French Society for Extracellular Vesicles (FSEV), Novembre 2017, Paris.
- Annual Meeting of Club Jeunes de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Avril 2017 Montpellier, France.
- 18th EURON Research & Student Days. Octobre, 2016, Lille, France.
- 6th Club Français de Neuro-Immunologie, Novembre 2015, Paris, France.

Communications Poster

- 19th EURON Research & Student Days, Octobre 2017, Maastricht, Netherland.
- The 21st Annual Meeting of the LARC-Neuroscience network, Octobre, 2017 Lille, France.
- Journée André Verber (membre organisateur) Septembre 2017 Lille, France.
- Annual Meeting International Society for Extracellular Vesicles Mai 2016. Rotterdam, Netherlands.
- 17th EURON Research & Student Days, Octobre 2015, Maastricht, Netherland.
- XII European Meeting on Glial Cells in Health, Juillet, 2015 Bilbao, Spain.

Certificats

- Extracellular vesicles: From biology to biomedical application, Avril 2018, EMBO, Heidelberg, Germany.
- How to Write and Publish a Scientific Paper, Mai 2016, Coursera Course
- Basics of Extracellular Vesicles, Septembre 2016, Coursera Course

AUTORISATIONS D'UTILISATION DES FIGURES

Toutes les autorisations ont été obtenues via l'interface *copyright clearance center*. Les demandes ont été faites sous la base de réutilisation dans le cadre d'une thèse/dissertation dans le cadre académique et à but non lucratif. Les figures 10 et 13 ainsi que 11-12 sont issues de la même publication et de ce fait, une seule autorisation par article a été demandée. Les figures 6, 7, 9, 15, 16 et 17 n'ont pas nécessité de demandes de droits de réutilisation car publiées dans des journaux en « open access ». Dans ce cas, seule l'affiliation au journal et la réattribution des droits aux auteurs sont exigées. Ces informations figurent en fin de chaque légende. Enfin, le panel b de la figure 22 vient des mesures réalisées par mes soins au laboratoire avec le nanosight NS300 et de ce fait n'exige pas de demande de permission.

Figure 1

ELSEVIER TERMS AND CONDITIONS

Nov 07, 2018

LICENSE

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4463861444951
License date	Nov 07, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Trends in Neurosciences
Licensed Content Title	Cajal's contributions to glia research
Licensed Content Author	Virginia García-Marín,Pablo García-López,Miguel Freire
Licensed Content Date	Sep 1, 2007
Licensed Content Volume	30
Licensed Content Issue	9
Licensed Content Pages	9
Start Page	479
End Page	487
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other

Autorisations d'utilisation des figures

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	anglais, français
Original figure numbers	figure 5
Title of your thesis/dissertation	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique
Expected completion date	Nov 2018
Estimated size (number of pages)	200
Requestor Location	Universite de Lille Cite Scientifique Villeneuve D'Ascq, other 59650 France Attn: Universite de Lille
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The

Autorisations d'utilisation des figures

Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by

you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript

Autorisations d'utilisation des figures

- via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
- directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
- for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

Figure 2



Autorisations d'utilisation des figures

**ELSEVIER
TERMS AND CONDITIONS****LICENSE**

Nov 08, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4464111202312
License date	Nov 08, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Molecular Immunology
Licensed Content Title	Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord
Licensed Content Author	Muriel Tahtouh,Françoise Croq,Jacopo Vizioli,Pierre-Eric Sautiere,Christelle Van Camp,Michel Salzet,Mohamed R. Daha,Joël Pestel,Christophe Lefebvre
Licensed Content Date	Feb 1, 2009
Licensed Content Volume	46
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	9
Start Page	523
End Page	531
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of 1 figures/tables/illustrations	
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier No article?	
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	2
Languages	French, English

Autorisations d'utilisation des figures

Original figure numbers	figure 1			
Title of your thesis/dissertation	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique			
Expected completion date	Nov 2018			
Estimated size (number of pages)	200			
Requestor Location	Universite Cite	de	Lille Scientifique	
	Villeneuve France Attn: Universite de Lille	D'Ascq,	other	59650
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12			
Total	0.00 EUR			

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

Autorisations d'utilisation des figures

7. **Reservation of Rights:** Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator

must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

Autorisations d'utilisation des figures

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Autorisations d'utilisation des figures

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Autorisations d'utilisation des figures

Figure 3

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
 Oct 29, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number

4458281211492

License date

Oct 29, 2018

Licensed Content Publisher

John Wiley and Sons

Licensed Content Publication

Developmental Neurobiology

Licensed Content Title

Microglia of medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) express a specific activation marker homologous to vertebrate ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1/alias aif-1)

Licensed Content Author

Francesco Drago, Pierre-Eric Sautière, Françoise Marrec-Croq, et al

Licensed Content Date

Apr 22, 2014

Licensed Content Volume

74

Licensed Content Issue

10

Licensed Content Pages

15

Type of use

Dissertation/Thesis

Requestor type

University/Academic

Format

Print and electronic

Portion

Figure/table

Number of figures/tables

1

Original Wiley figure/table number(s)

Figure 5

Will you be translating?

Yes, including English rights

Number of languages

1

Languages

French English

Autorisations d'utilisation des figures

Title of your thesis / dissertation

Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique

Expected completion date

Nov 2018

Expected size (number of pages)

200

Requestor Location

Universite

de

Lille

Cite

Scientifique

Villeneuve

D'Ascq,

other

59650

France

Attn: Universite de Lille

Publisher Tax ID

EU826007151

Total

0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified,

Autorisations d'utilisation des figures

adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts.** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY

Autorisations d'utilisation des figures

FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

Autorisations d'utilisation des figures

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Figure 4

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 07, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4463881010639
License date	Nov 07, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	British Journal of Haematology
Licensed Content Title	The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma
Licensed Content Author	Peter Wolf
Licensed Content Date	Mar 12, 2008
Licensed Content Volume	13
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	24
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

Autorisations d'utilisation des figures

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	3
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	2
Languages	english french
Title of your thesis / dissertation	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique
Expected completion date	Nov 2018
Expected size (number of pages)	200
Requestor Location	Universite de Lille Cite Scientifique
	Villeneuve D'Ascq, other 59650 France Attn: Universite de Lille
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the

Autorisations d'utilisation des figures

license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,**You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

Autorisations d'utilisation des figures

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

Autorisations d'utilisation des figures

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Autorisations d'utilisation des figures

Figure 5

**SPRINGER
TERMS AND CONDITIONS****NATURE****LICENSE**

Nov 08, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4464130201341
License date	Nov 08, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Medicine
Licensed Content Title	Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes
Licensed Content Author	Laurence Zitvogel, Armelle Regnault, Anne Lozier, Joseph Wolfers, Caroline Flament et al.
Licensed Content Date	May 1, 1998
Licensed Content Volume	4
Licensed Content Issue	5
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number figures/tables/illustrations	of 1
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique
Institution name	n/a
Expected presentation date	Nov 2018
Portions	Figure 2

Autorisations d'utilisation des figures

Specific Languages	french, english			
Requestor Location	Universite Cite	de	Lille Scientifique	
	Villeneuve France Attn: Universite de Lille	D'Ascq,	other	59650
Billing Type	Invoice			
Billing Address	Universite Cite	de	Lille Scientifique	
	Villeneuve Attn: Tanina Arab	D'Ascq,	France	59650
Total	0.00 EUR			

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where **'reuse in a dissertation/thesis'** has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal->

Autorisations d'utilisation des figures

affairs/permissions/permissions-guidelines/), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.

7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g.

Autorisations d'utilisation des figures

Palgrave Macmillan, Springer etc) [Book Title] by [Book author(s)]
[COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Figure 8

JOHN WILEY AND SONS LICENSE

Nov 11, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4464160998341
License date	Nov 08, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	The EMBO Journal
Licensed Content Title	ESCRTs are everywhere
Licensed Content Author	James H Hurley
Licensed Content Date	Aug 26, 2015
Licensed Content Volume	34
Licensed Content Issue	19
Licensed Content Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 2 Figure 3
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	2
Languages	English French
Title of your thesis / dissertation	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique
Expected completion date	Nov 2018
Expected size (number of pages)	200

Autorisations d'utilisation des figures

Requestor Location	Universite Cite	de	Lille Scientifique
	Villeneuve France Attn: Universite de Lille	D'Ascq, other	59650
Publisher Tax ID	EU826007151		
Total	0.00 EUR		
Terms and Conditions			

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts.** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

Autorisations d'utilisation des figures

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

Autorisations d'utilisation des figures

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Figures 10 - 13

SPRINGER
TERMS AND CONDITIONS

NATURE

LICENSE

Nov 08, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4464190079410
License date	Nov 08, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Molecular Cell Biology
Licensed Content Title	Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles
Licensed Content Author	Guillaume van Niel, Gisela D'Angelo, Graça Raposo
Licensed Content Date	Jan 17, 2018
Licensed Content Volume	19
Licensed Content Issue	4
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number figures/tables/illustrations	of 2
High-res required	no
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501

Autorisations d'utilisation des figures

Author of this Springer Nature no
content

Title	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique			
Institution name	n/a			
Expected presentation date	Nov 2018			
Portions	Figure 4 Figure 5			
Specific Languages	frensh, english			
Requestor Location	Universite	de	Lille	
	Cite		Scientifique	
	Villeneuve	D'Ascq,	other	59650
	France			
	Attn: Universite de Lille			
Billing Type	Invoice			
Billing Address	Universite	de	Lille	
	Cite		Scientifique	
	Villeneuve	D'Ascq,	France	59650
	Attn: Tanina Arab			
Total	0.00 EUR			

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

Autorisations d'utilisation des figures

4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For	Journal	Content:
Reprinted by permission from [the Licensor]:	[Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)]	[JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]
For Advance	Online	Publication papers:
Reprinted by permission from [the Licensor]:	[Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)]	[JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]
For	Adaptations/Translations:	
Adapted/Translated by permission from [the Licensor]:	[Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)]	[JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]
Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:		
Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL		

Autorisations d'utilisation des figures

NAME] **[REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name),
[COPYRIGHT] (year of publication)

For **Advance** **Online** **Publication** papers:
 Reprinted by permission from The **[the Licensor]**: on behalf of Cancer Research UK:
[Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] **[JOURNAL NAME]**
[REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), **[COPYRIGHT]**
 (year of publication), advance online publication, day month year (doi:
 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])

For **Book** **content:**
 Reprinted/adapted by permission from **[the Licensor]**: **[Book Publisher** (e.g.
 Palgrave Macmillan, Springer etc) **[Book Title]** by **[Book author(s)]**
[COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.1

**Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or
 +1-978-646-2777.**

Figures 11 - 12

THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY ORDER DETAILS

Nov 08, 2018

Order Number	501442435
Order date	Nov 08, 2018
Licensed Content Publisher	The American Physiological Society
Licensed Publication	Content Physiology
Licensed Content Title	Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin
Licensed Content Author	Bénédicte Hugel, M. Carmen Martínez, Corinne Kunzelmann, et al
Licensed Content Date	Feb 1, 2005
Licensed Content Volume	20
Licensed Content Issue	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-profit academic/educational

Autorisations d'utilisation des figures

Readers being charged a fee No
for this work

Format print and electronic

Portion figures/tables/images

Number of 2
figures/tables/images

Will you be translating? yes

Number of languages 1

Languages French English

World Rights English plus translations

Order reference number

Title Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine
microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique

Institution name n/a

Expected presentation date Nov 2018

Portions Figure 1
Figure 2

Specific Languages French
English

Requestor Location Universite de Lille
Cite Scientifique

Villeneuve D'Ascq, other 59650
France
Attn: Universite de Lille

Figure 14

SPRINGER
TERMS AND CONDITIONS

NATURE

LICENSE

Nov 08, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number 4464291216893

License date Nov 08, 2018

Licensed Content Publisher Springer Nature

Autorisations d'utilisation des figures

Licensed Content Publication	Nature Structural & Molecular Biology
Licensed Content Title	Mechanics of membrane fusion
Licensed Content Author	Leonid V Chernomordik, Michael M Kozlov
Licensed Content Date	Jul 3, 2008
Licensed Content Volume	15
Licensed Content Issue	7
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of 1 figures/tables/illustrations	
High-res required	no
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique
Institution name	n/a
Expected presentation date	Nov 2018
Portions	Figure 1
Specific Languages	French English
Requestor Location	Universite de Lille Cite Scientifique
	Villeneuve D'Ascq, other 59650 France Attn: Universite de Lille
Billing Type	Invoice
Billing Address	Universite de Lille Cite Scientifique

Autorisations d'utilisation des figures

Villeneuve D'Ascq, France 59650
Attn: Tanina Arab

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the

Autorisations d'utilisation des figures

meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.

10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For	Journal	Content:
Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]		
For Advance	Online	Publication papers:
Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]		
For	Adaptations/Translations:	
Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]		
Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:		
Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]		
For Advance	Online	Publication papers:
Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]		
For	Book	content:
Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)		

Other Conditions:

Version 1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Autorisations d'utilisation des figures

Figure 18




Title: Magnetic Nanosensor for Detection and Profiling of Erythrocyte-Derived Microvesicles

Author: Junsung Rho, Jaehoon Chung, Hyungsoon Im, et al

Publication: ACS Nano

Publisher: American Chemical Society

Date: Dec 1, 2013

Copyright © 2013, American Chemical Society

Logged in as:
Tanina Arab
Université de Lille
Account #:
3001357730

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

Autorisations d'utilisation des figures

Figure 19

**SPRINGER
TERMS AND CONDITIONS****NATURE****LICENSE**

Nov 09, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4464770417232
License date	Nov 09, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Nanotechnology
Licensed Content Title	Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm
Licensed Content Author	Benjamin H. Wunsch, Joshua T. Smith, Stacey M. Gifford, Chao Wang, Markus Brink et al.
Licensed Content Date	Aug 1, 2016
Licensed Content Volume	11
Licensed Content Issue	11
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of 1 figures/tables/illustrations	
High-res required	no
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature no content	
Title	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique
Institution name	n/a
Expected presentation date	Nov 2018

Autorisations d'utilisation des figures

Portions	Figure 1			
Specific Languages	French English			
Requestor Location	Universite Cite	de	Lille Scientifique	
	Villeneuve France Attn: Universite de Lille	D'Ascq,	other	59650
Billing Type	Invoice			
Billing Address	Universite Cite	de	Lille Scientifique	
	Villeneuve Attn: Tanina Arab	D'Ascq,	France	59650
Total	0.00 EUR			

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where **'reuse in a dissertation/thesis'** has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).

Autorisations d'utilisation des figures

6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For	Journal	Content:
Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)]	[JOURNAL NAME]	[REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]
For Advance	Online	Publication papers:
Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)]	[JOURNAL NAME]	[REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]
For	Adaptations/Translations:	
Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)]	[JOURNAL NAME]	[REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]
Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:		
Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]		
For Advance	Online	Publication papers:
Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT]		

Autorisations d'utilisation des figures

(year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])

For **Book** **content:**
 Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)]
 [COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Figure 20

Z. Zhao, Y. Yang, Y. Zeng and M. He, *Lab Chip*, 2016, **16**, 489

DOI: 10.1039/C5LC01117E

This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence. Material from this article can be used in other publications provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material and it is not used for commercial purposes.

Reproduced material should be attributed as follows:

- For reproduction of material from NJC:
[Original citation] - Published by The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC.
- For reproduction of material from PCCP:
[Original citation] - Published by the PCCP Owner Societies.
- For reproduction of material from PPS:
[Original citation] - Published by The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and RSC.
- For reproduction of material from all other RSC journals:
[Original citation] - Published by The Royal Society of Chemistry.

Autorisations d'utilisation des figures

Figure 21






Title: New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles

Author: Huilin Shao, Hyungsoon Im, Cesar M. Castro, et al

Publication: Chemical Reviews

Publisher: American Chemical Society

Date: Feb 1, 2018

Copyright © 2018, American Chemical Society

Logged in as:

Tanina Arab

Université de Lille

Account #:

3001357730

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

Autorisations d'utilisation des figures

Figure 23

**ELSEVIER
TERMS AND CONDITIONS****LICENSE**

Nov 09, 2018

This Agreement between Universite de Lille -- Tanina Arab ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4464880565997
License date	Nov 09, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Neuroscience
Licensed Content Title	Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia
Licensed Content Author	Rosa C. Paolicelli,Giorgio Bergamini,Lawrence Rajendran
Licensed Content Date	Available online 13 April 2018
Licensed Content Volume	n/a
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	1
Start Page	0
End Page	0
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	french enslish
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Caracterisation de vésicules extracellulaires d'origine microgliale et mise en evidence de leur effet neurotrophique

Autorisations d'utilisation des figures

Expected completion date	Nov 2018
Estimated size (number of pages)	200
Requestor Location	Universite de Lille Cite Scientifique
	Villeneuve D'Ascq, other 59650 France Attn: Universite de Lille
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the

Autorisations d'utilisation des figures

transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books

Autorisations d'utilisation des figures

at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-

Autorisations d'utilisation des figures

adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article

Autorisations d'utilisation des figures

(including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

ANNEXES

Tableau supplémentaire 1 : contenu protéique F1

Protein Ids	Gene Name
P62987	UBA52
P62805	HIST1H4A
P02549	SPTA1
P27216	ANXA13
P01023	A2M
P02545	LMNA
P02647	APOA1
P04040	CAT
P04406	GAPDH
Q99878	HIST1H2AJ
P05089	ARG1
P05109	S100A8
P06576	ATP5B
P06702	S100A9
P06733	ENO1
P07355; A6NMY6	ANXA2; ANXA2P2
P07900	HSP90AA1
P11142	HSPA8
P12273	PIP
P14923; P35222	JUP
P15924	DSP
Q96P63	SERPINB12
Q96QA5	GSDMA

Protein Ids	Gene Name
P20742	PZP
P22735	TGM1
P25311	AZGP1
P29508	SERPINB3
P31151	S100A7
P31944	CASP14
P35908	KRT2
P42357	HAL
P60709; P63261	ACTB; ACTG1
Q5VTE0; P68104	EEF1A1P5; EEF1A1
P81605	DCD
Q01469; A8MUU1	FABP5
Q02413	DSG1
Q08188	TGM3
Q08554	DSC1
Q13557	CAMK2D
Q13835	PKP1
Q13867	BLMH
Q16777	HIST2H2AC
Q5T749	KPRP
Q5T750	XP32
Q6UWP8	SBSN
Q6ZVX7	NCCRP1

Tableau supplémentaire 2 : contenu protéique F2

Protein IDs	Gene name
P04406	GAPDH
P48058	GRIA4
P62987	UBA52
P07900	HSP90AA1
P02549	SPTA1
P27216	ANXA13
O14818; Q8TAA3	PSMA7; PSMA8
O75223	GGCT
P01040	CSTA
P01857	IGHG1
P01876	IGHA1
P02545	LMNA
P02788	LTF
P04040	CAT

Protein IDs	Gene name
P22735	TGM1
P25311	AZGP1
P25788	PSMA3
P29508	SERPINB3
P31151	S100A7
P31944	CASP14
P35908	KRT2
P42357	HAL
P47929	LGALS7
P60709	ACTB; ACTG1
Q5VTE0; P68104	EEF1A1P5; EEF1A1
P81605	DCD
Q01469	FABP5
Q02413	DSG1

Annexes

P04406	GAPDH
P04792	HSPB1
Q99878	HIST1H2AJ
P05089	ARG1
P05109	S100A8
P06702	S100A9
P06733	ENO1
P07339	CTSD
P07355;A6NMY6	ANXA2;ANXA2P2
P11142	HSPA8
P13639;Q15029	EEF2
P14618;P30613	PKM
P14923	JUP
P15924	DSP
Q9NZT1	CALML5

Q06830	PRDX1
Q08188	TGM3
Q08554	DSC1
Q13835	PKP1
Q13867	BLMH
Q14574	DSC3
Q15517	CDSN
Q16777	HIST2H2AC
Q5T749	KPRP
Q5T750	XP32
Q6UWP8	SBSN
Q6ZVX7	NCCRP1
Q8WVV4	POF1B
Q96P63	SERPINB12
Q96QA5	GSDMA

Tableau supplémentaire 3 : contenu protéique F3

Protein IDs	Gene names
P41732	TSPAN7A
O15394	NCAM2
P20073	ANXA7
Q86YT5	SLC13A5
P61601	NCALD
P04406	GAPDH
P48058	GRIA4, GLUR4
P62987	UBA52
P28331	NDUFS1
O15394	NCAM2
Q9H4M9	EHD1
P25705	ATP5A1
P11277	SPTB, SPTB1
P40925	MDH1
P62805	HIST1H4A
P05023	ATP1A1
P20073	ANXA7
P08758	ANXA5
Q16720	ATP2B3
P50395	GDI2
P04075	ALDOA, ALDA
P62166	NCS1
P55786	NPEPPS
P11216	PYGB
Q14254	FLOT2
P02549	SPTA1, SPTA
P02549	SPTA1, SPTA

Protein IDs	Gene names
P04083	ANXA1
P04406	GAPDH
Q99878	HIST1H2AJ
P05089	ARG1
P05109	S100A8
P06576	ATP5B
P06702	S100A9
P06733	ENO1
P07355	ANXA2;ANXA2P2
P08238	HSP90AB1
P12273	PIP
P13639	EEF2
P14618	PKM
P14923	JUP
P15924	DSP
P22735	TGM1
P25311	AZGP1
P29508	SERPINB3
P31151	S100A7
P31944	CASP14
P35908	KRT2
P60709	ACTB;ACTG1
P63010	AP2B1
Q5VTE0	EEF1A1P5;EEF1A1
P81605	DCD
P84090	ERH
Q01469	FABP5

Annexes

P52789	HK2
O75131	CPNE3
Q68DQ2	CRYBG3
P27216	ANXA13, ANX13
P02549	SPTA1, SPTA
P02549	SPTA1, SPTA
Q99880	HIST1H2B
O75223	GGCT
P02545	LMNA
P04075	ALDOA
Q96P63	SERPINB12
Q9NZT1	CALML5
Q9UQM7	CAMK2A

Q02413	DSG1
Q06830	PRDX1
Q08188	TGM3
Q08554	DSC1
Q13557	CAMK2D
Q13835	PKP1
Q13867	BLMH
Q15517	CDSN
Q5T749	KPRP
Q5T750	XP32
Q6UWP8	SBSN
Q6ZVX7	NCCRP1
Q8WVV4	POF1B

Tableau supplémentaire 4 : contenu protéique F4

Protein IDs	Gene names
Q9UIQ6	LNPEP
Q9MYU4	ENTPD1
P21333	FLNA
Q16822	PCK2, PEPCK2
A0FGR9	ESYT3
P40123	CAP2
P41732	TSPAN7A
P13591	NCAM1
O15394	NCAM2, NCAM21
P20073	ANXA7
Q86YT5	SLC13A5
P42765	ACAA2
Q9NZN3	EHD3
P40227	CCT6A
P50990	CCT8
Q9BYV1	AGXT2
Q6NSJ0	MYORG, KIAA1161
P01116	KRAS
Q9NZM1	MYOF
Q9HAC7	SUGCT
A0FGR8	ESYT2
Q9H0C2	SLC25A31
P08559	PDHA1, PHE1A
P48728	AMT, GCST
P50148	GNAQ, GAQ
Q12955	ANK3
P61601	NCALD
P22303	ACHE

Protein IDs	Gene names
P22303	ACHE
P63010	AP2B1, ADTB2, CLAPB1
Q9H4M9	EHD1
Q00169	PITPNA, PITPN
Q05193	DNM1, DNM
P35573	AGL
Q14254	FLOT2
Q9H4B7	TUBB1
P11217	PYGM
P62266	RPS23
P78371	CCT2
Q8NF91	SYNE1
P28838	LAP3
P02549	SPTA1, SPTA
O43570	CA12
Q9P2R7	SUCLA2
P17987	TCP1
P31040	SDHA, SDH2, SDHF
P35573	AGL, GDE
Q00610	CLTC
P17858	PFKL
Q14204	DYNC1H1
Q13813	SPTAN1
P17858	PFKL
P02549	SPTA1, SPTA
P52789	HK2
P09471	GNAO1
P98164	LRP2

Annexes

Q5R3I4	TTC38
Q9Y281	CFL2
Q9Y2M2	SSUH2
Q96FN4	CPNE2
Q99497	PARK7
P04843	RPN1
P04406	GAPDH
P35241	RDX
Q9UNW1	MINPP1
P60174	TPI1, TPI
O00534	VWA5A
P06576	ATP5B
P62258	YWHAE
P48058	GRIA4, GLUR4
Q9UBV8	PEF1
Q8TE04	PANK4
P15531	NME1
P09936	UCHL1
P55087	AQP4
Q16891	IMMT
O75306	NDUFS2
P00505	GOT2
P40926	MDH2
Q9BW91	NUDT9
P50991	CCT4
P80404	ABAT
O75311	GLRA3
P32121	ARRB2
Q92959	SLCO2A1
P62987	UBA52
P35573	AGL
Q14764	MVPLRP
Q07837	SLC3A1
P28331	NDUFS1
P55072	VCP
Q99460	PSMD1
P35606	COPB2
Q2TAA5	ALG11; GT8
P30531	SLC6A1
O95202	LETM1
O15394	NCAM2
P40926	MDH2
O60635	TSPAN1
P13639	EEF2, EF2
P50993	ATP1A2

Q12955	ANK3
O75131	CPNE3
Q9HAV0	GNB4
Q68DQ2	CRYBG3
Q9H2A2	ALDH8A1
Q13813	SPTAN1
P11217	PYGM
P05026	ATP1B1, ATP1B
Q9HAV0	GNB4
P31040	SDHA, SDH2, SDHF
Q6UY18	LINGO4
Q9H330	TMEM245
P15531	NME1
P30153	PPP2R1A
P62826	RAN
Q16620	NTRK2, TRKB
P38606	ATP6V1A
Q8WWI5	SLC44A1
P49591	SARS
Q9P2R7	SUCLA2
P27216	ANXA13, ANX13
P02549	SPTA1, SPTA
P26641	EEF1G, EF1G
Q14204	DYNC1H1
Q16822	PCK2
P36957	DLST
P22314	UBA1
P14618	PKM
P29401	TKT
Q92598	HSPH1, HSP105
P09467	FBP1, FBP
P28838	LAP3
P02549	SPTA1, SPTA
P22309	UGT1A1
Q13200	PSMD2, TRAP2
O00299	CLIC1
O14818; Q8TAA3	PSMA7;PSMA8
O43548	TGM5
O43707;P12814; P35609	ACTN4;ACTN1
O60437	PPL
Q99880	HIST1H2BL
O75223	GGCT
O75342	ALOX12B
P00338	LDHA
P00491	PNP

Annexes

P22694	PRKACB
Q9H4M9	EHD1
P09493	TPM1
O43301	HSPA12A
P18206	VCL
P07951	TPM2, TMSB
O75473	LGR5
P32119	PRDX2
P48506	GCLC
P36543	ATP6V1E1
Q06830	PRDX1
A6NGN9	IGLON5
P25705	ATP5F1A
P05091	ALDH2
P31150	GDI1
Q9H3G5	CPVL
P43004	SLC1A2
P11177	PDHB, PHE1B
P41250	GARS
P23416	GLRA2
P35613	BSG
P14618	PKM
Q01484	ANK2, ANKB
P55087	AQP4
P35611	ADD1, ADDA
P04844	RPN2
P21695	GPD1
P11277	SPTB, SPTB1
Q16822	PCK2
P40925	MDH1
O75131	CPNE3
P62805	HIST1H4A
Q01362	MS4A2
Q86WB7	UNC93A
P05023	ATP1A1
P36871	PGM1
P14868	DARS
P20340	RAB6A, RAB6
P14625	HSP90B1
Q9HCJ6	VAT1L
P55072	VCP
P20073	ANXA7
Q6PIU2	NCEH1
P62937	PPIA
Q13423	NNT

P00558;P07205	PGK1;PGK2
P01040	CSTA
P01857	IGHG1
P01876;P01877	IGHA1
P02545	LMNA
P02786	TFRC
P02788	LTF
P04040	CAT
P04075	ALDOA
P04406	GAPDH
P04792	HSPB1
Q99878	HIST1H2AJ
P05023	ATP1A1
P05089	ARG1
P05109	S100A8
P06396	GSN
P06702	S100A9
P06733	ENO1
P07339	CTSD
P07355;A6NMY6	ANXA2;ANXA2P2
P09211	GSTP1
P11021	HSPA5
P11142	HSPA8
P11217;P11216; P06737	PYGM;PYGB;PYGL
P12273	PIP
P13489	RNH1
P13639;Q15029	EEF2
P14618;P30613	PKM
P14735	IDE
P14923	JUP
P15924	DSP
P19971	TYMP
P21281;P15313	ATP6V1B2;ATP6V1B1
P21333	FLNA
P22735	TGM1
P23526	AHCY
P25311	AZGP1
P27348	YWHAQ
P29508	SERPINB3
P31151	S100A7
P31944	CASP14
P31947	SFN
P34931	HSPA1L
P35579	MYH9
P35908	KRT2

Annexes

P08758	ANXA5
P21912	SDHB, SDH, SDH1
Q16720	ATP2B3
P00367	GLUD1
P22694	PRKACB
O95741	CPNE6
P10809	HSPD1, HSP60
A1L157	TSPAN11
Q12955	ANK3
Q6GMR7	FAAH2
P50395	GDI2
P60953	CDC42
P09622	DLD
P04075	ALDOA, ALDA
P51572	BCAP31
Q14195	DPYSL3
P07900	HSP90AA1
Q6ZSS7	MFSD6
Q01484	ANK2
Q9Y4L1	HYOU1
Q9H330	TMEM245
P62166	NCS1
Q15084	PDIA6
O94760	DDAH1
P13861	PRKAR2A
Q6YP21	KYAT3
Q14204	DYHC1
P49961	ENTPD1
P11021	HSPA5G, RP78
P04075	ALDO, AALDA
P50148	GNAQ, GAQ
Q00765	REEP5
P49411	TUFM
P55786	NPEPPS
P30042	C21orf33HES1KNPI
Q9BWD1	ACAT2
A8K2U0	A8K2U0
P53396	ACLY
P35611	ADD1, ADDA
P11216	PYGB
P48602	Vha68-1

P36952	SERPINB5
P38606	ATP6V1A
P42357	HAL
P47929	LGALS7
P48594	SERPINB4
P49748	ACADVL
P55072	VCP
P60174	TPI1
P60709	ACTB;ACTG1
P60842	EIF4A1;EIF4A2
P61158;Q9P1U1	ACTR3;ACTR3B
P61626	LYZ
P63104	YWHAZ
P68133	ACTA1
Q5VTE0;P68104	EEF1A1P5;EEF1A1
P81605	DCD
Q00610;P53675	CLTC
Q01469;A8MUU1	FABP5
Q01546	KRT76
Q02413	DSG1
Q06830	PRDX1
Q08188	TGM3
Q08554	DSC1
Q13813	SPTAN1
Q13835	PKP1
Q13867	BLMH
Q14204	DYNC1H1
Q15149	PLEC
Q15517	CDSN
Q71UI9;P0C0S5; Q96QV6	HIST2H2AC;HIST2 H2AA3
Q5T749	KPRP
Q5T750	XP32
Q6UWP8	SBSN
Q6ZVX7	NCCRP1
Q71U36	TUBA1A
Q7Z406;P35749	MYH14
Q8WVV4	POF1B
Q96P63	SERPINB12
Q96QA5	GSDMA
Q9HCY8	S100A14
Q9NZT1	CALML5

Tableau supplémentaire 5 : contenu protéique F5

Protein Ids	Gene names
Q9UIQ6	LNPEP
P49961	ENTPD1
P21333	FLNA
Q16822	PCK2
P40123	CAP2
P41732	TSPAN7A
O15394	NCAM2, NCAM21
P20073	ANXA7
P17050	NAGA
Q86YT5	SLC13A5
P42765	ACAA2
Q9NZN3	EHD3
P40227	CCT6A
P50990	CCT8
Q9BYV1	AGXT2
Q6NSJ0	MYORG, KIAA1161
Q9NZM1	MYOF
Q9H9P8	L2HGDHC14orf160
Q9HAC7	SUGCT
A0FGR8	ESYT2
Q9H0C2	SLC25A31
P48728	AMT, GCST
P50148	GNAQ, GAQ
Q12955	ANK3
P61601	NCALD
P22303	ACHE
Q5R3I4	TTC38
Q9Y2M2	SSUH2
Q96FN4	CPNE2
Q99497	PARK7
P04406	GAPDH
P35241	RDX
P60174	TPI1, TPI
O00534	VWA5A
P06576	ATP5B
Q8TED1	GPX8
P62258	YWHAE
P48058	GRIA4, GLUR4
Q9UBV8	PEF1
Q8TE04	PANK4
P09936	UCHL1
P55087	AQP4
Q16891	IMMT

Protein Ids	Gene names
Q00765	REEP5
P49411	TUFM
P55786	NPEPPS
P30042	C21orf33HES1KNPI
P61158	ACTR3
Q9BWD1	ACAT2
P11216	PYGB
P48602	Vha68-1
P22303	ACHE
Q9H4M9	EHD1
P35573	AGL
Q14254	FLOT2
Q9H4B7	TUBB1
P11217	PYGM
P78371	CCT2
Q8NF91	SYNE1
P02549	SPTA1, SPTA
Q9P2R7	SUCLA2
P31040	SDHA, SDH2, SDHF
Q00610	CLTC
P17858	PFKL
Q14204	DYHC1
Q13813	SPTAN1
Q16822	PCK2
P02549	SPTA1, SPTA
P52789	HK2
P98164	LRP2
P07954	FH
Q12955	ANK3
Q9P2R7	SUCLA2
O75131	CPNE3
Q9HAV0	GNB4
Q68DQ2	CRYBG3
Q13813	SPTAN1
P11217	PYGM
P05026	ATP1B1, ATP1B
P15531	NME1
P30153	PPP2R1A
P62826	RAN
Q16620	NTRK2, TRKB
P35232	PHB
P38606	ATP6V1A
Q8WWI5	SLC44A1

Annexes

P00505	GOT2
P40926	MDH2
P50991	CCT4
P80404	ABAT
O75311	GLRA3
P32121	ARRB2
P62987	UBA52
P35573	AGL
Q14764	MVPLRP
P28331	NDUFS1
P30531	SLC6A1
O95202	LETM1
O15394	NCAM2, NCAM21
P40926	MDH2
O60635	TSPAN1
P24534	EEF1B2
P13639	EEF2, EF2
P22694	PRKACB
Q9H4M9	EHD1
P09493	TPM1
O43301	HSPA12A
P18206	VCL
P07951	TPM2, TMSB
P32119	PRDX2
Q06830	PRDX1
A6NGN9	IGLON5
P25705	ATP5F1A
P05091	ALDH2
P31150	GDI1
P21333	FLNA
Q9H3G5	CPVL
P15104	GLUL
P43004	SLC1A2
P41250	GARS
Q8TAA3	PSMA8
P23416	GLRA2
P35613	BSG
P14618	PKM
P55087	AQP4
P35611	ADD1, ADDA
P04844	RPN2
P21695	GPD1
P11277	SPTB, SPTB1
P40925	MDH1
O75131	CPNE3
P62805	HIST1H4A

P40926	MDH2
Q9P2R7	SUCLA2
P27216	ANXA13, ANX13
P02549	SPTA1, SPTA
P26641	EEF1G, EF1G
Q14204	DYHC1
Q16822	PCK2
P36957	DLST
P22314	UBA1
P14618	PKM
P29401	TKT
Q92598	HSPH1, HSP105
P09467	FBP1, FBP
P28838	LAP3
P02549	SPTA1, SPTA
P22309	UGT1A1
Q99880	HIST1H2BL
O75223	GGCT
P00558;P07205	PGK1;PGK2
P01040	CSTA
P01857	IGHG1
P01876;P01877	IGHA1
P02786	TFRC
P02788	LTF
P04040	CAT
P04075	ALDOA, ALDA
P04259	KRT6B
P04406	GAPDH
P04745	AMY1A
P04792	HSPB1
Q99878	HIST1H2AJ
P05089	ARG1
P05109	S100A8
P06396	GSN
P06702	S100A9
P06733	ENO1
P07339	CTSD
P07355;A6NMY6	ANXA2;ANXA2P2
P11021	HSPA5G, RP78
P11142	HSPA8
P11217;P11216;P06737	PYGM;PYGB;PYGL
P12273	PIP
P13639;Q15029	EEF2
P14618;P30613	PKM
P14923	JUP
P15924	DSP

Annexes

Q01362	MS4A2
Q86WB7	UNC93A
P36871	PGM1
P14625	HSP90B1
Q9HCJ6	VAT1L
P55072	VCP
Q6PIU2	NCEH1
P62937	PPIA
Q13423	NNT
P21912	SDHB, SDH, SDH1
Q16720	ATP2B3
P00367	GLUD1
P22694	PRKACB
P10809	HSPD1, HSP60
Q12955	ANK3
P50395	GDI2
P60953	CDC42
P09622	DLD
P04075	ALDOA, ALDA
P51572	BCAP31
Q14195	DPYSL3
P07900	HSP90AA1
Q01484	ANK2, ANKB
Q99832	CCT7
Q9H330	TMEM245
P62166	NCS1
Q15084	PDIA6
O94760	DDAH1
Q6YP21	KYAT3
Q14204	DYHC1
P49961	ENTPD1
P26639	TARS
P11021	HSPA5G, RP78
P04075	ALDOA, ALDA
P50148	GNAQ, GAQ
Q96QA5	GSDMA

P22735	TGM1
P23526	AHCY
P25311	AZGP1
P25788	PSMA3
P29508	SERPINB3
P31151	S100A7
P31944	CASP14
P32119	PRDX2
P35908	KRT2
P38606	ATP6V1A
P42357	HAL
P47929	LGALS7
P48594	SERPINB4
P55072	VCP
P60709	ACTB
P61626	LYZ
Q5VTE0;P68104	EEF1A1P5;EEF1A1
P81605	DCD
Q01469;A8MUU1	FABP5
Q01546	KRT76
Q02413	DSG1
Q06830	PRDX1
Q08188	TGM3
Q08554	DSC1
Q13813	SPTAN1
Q13835	PKP1
Q13867	BLMH
Q15517	CDSN
Q16777	HIST2H2AC
Q5T749	KPRP
Q5T750	XP32
Q6UWP8	SBSN
Q8WVV4	POF1B
Q96DA0	ZG16B
Q96P63	SERPINB12

Tableau supplémentaire 6 : contenu protéique F6

Protein Ids	Gene names
Q9MYU4	ENTPD1
P21333	FLNA
P04040	CAT
Q9UBX3	SLC25A10
P41732	TSPAN7A
P42704	LRPPR

Protein Ids	Gene names
P26641	EEF1G, EF1G
Q14204	DYHC1
P36957	DLST
Q15102	PAFAH1B3
P22314	UBA1
P14618	PKM

Annexes

O15394	NCAM2, NCAM21
P20073	ANXA7
P17050	NAGA
Q86YT5	SLC13A5
P42765	ACAA2
Q9NZN3	EHD3
P40227	CCT6A
P50990	CCT8
Q9BYV1	AGXT2
Q6NSJ0	MYORG, KIAA1161
Q9NZM1	MYOF
Q9HAC7	SUGCT
A0FGR8	ESYT2
O43149	ZZEF1
Q9H0C2	SLC25A31
P49450	CENPA
P08559	PDHA1, PHE1A
P48728	AMT, GCST
P50148	GNAQ, GAQ
Q12955	ANK3
P61601	NCALD
P22303	ACHE
Q5R3I4	TTC38
Q9Y2M2	SSUH2
Q96FN4	CPNE2
Q99497	PARK7
P04406	GAPDH
P62979	RPS27A
P60174	TPI1, TPI
O00534	VWA5A
P06576	ATP5B
P62258	YWHAE
P48058	GRIA4, GLUR4
P67775	PPP2CA
Q9UBV8	PEF1
O95182	NDUFA7
P09936	UCHL1
P55087	AQP4
Q16891	IMMT
O75306	NDUFS2
P00505	GOT2
P40926	MDH2
P80404	ABAT
O75311	GLRA3
P62987	UBA52
P35573	AGL

P29401	TKT
Q92598	HSPH1, HSP105
P09467	FBP1, FBP
P28838	LAP3
P02549	SPTA1, SPTA
P22309	UGT1A1
Q13200	PSMD2, TRAP2
O00299	CLIC1
O15523;O00571	DDX3Y;DDX3X
O14732	IMPA2
O14818;Q8TAA3	PSMA7;PSMA8
O43175	PHGDH
O43240	KLK10
O43548	TGM5
O43707;P12814	ACTN4;ACTN1
O60437	PPL
Q99880	HIST1H2BL
O75223	GGCT
O75342	ALOX12B
O75369	FLNB
O95833	CLIC3
P00338	LDHA
P00491	PNP
P01040	CSTA
P01857	IGHG1
P01859;P01861	IGHG2;IGHG4
P01876	IGHA1
P02545	LMNA
P02786	TFRC
P02788	LTF
P04040	CAT
P04075	ALDOA, ALDA
P04083	ANXA1
P04406	GAPDH
P04792	HSPB1
P04843	RPN1
Q99878	HIST1H2AJ
P05023	ATP1A1
P05089	ARG1
P05091	ALDH2
P05109	S100A8
P12236;P05141;	SLC25A6
P05387	RPLP2
P06396	GSN
P06702	S100A9
P06733	ENO1

Annexes

Q14764	MVPLRP
P28331	NDUFS1
P55072	VCP
P28066	PSMA5
Q8IW92	GLB1L2
P30531	SLC6A1
O95202	LETM1
O15394	NCAM2, NCAM21
P40926	MDH2
P13639	EEF2, EF2
Q9BWM7	SFXN3
P22694	PRKACB
Q9H4M9	EHD1
P09493	TPM1
O43301	HSPA12A
P18206	VCL
P07951	TPM2, TMSB
P32119	PRDX2
Q06830	PRDX1
Q9Y4W6	AFG3L2
A6NGN9	IGLON5
P25705	ATP5F1A
P05091	#N/A
P31150	GDI1
Q6RUV5	CPVL
Q9H3G5	CPVL
P15104	GLUL
P43004	SLC1A2
P11177	PDHB, PHE1B
Q8TAA3	PSMA8
P23416	GLRA2
P14618	PKM
P55087	AQP4
P22303	ACHE
P35611	ADD1, ADDA
P04844	RPN2
P04181	OAT
P11277	SPTB, SPTB1
P28330	ACADL
P36542	ATP5
P40925	MDH1
O75131	CPNE3
P62805	HIST1H4A
Q01362	MS4A2
Q86WB7	UNC93A
P36871	PGM1

P06753	TPM3
P07339	CTSD
P07355;A6NMY6	ANXA2;ANXA2P2
P07384	CAPN1
P07476	IVL
P08670	VIM
P08865	RPSA
P09211	GSTP1
P09525	ANXA4
P09972	ALDOC
P0DMV9;P0DMV8	HSPA1B;HSPA1A
P10599	TXN
P11021	HSPA5G, RP78
P11142	HSPA8
P11217;P11216	PYGM;PYGB;PYGL
P11940	PABPC1
P12081;P49590	HARS;HARS2
P12273	PIP
P13489	RNH1
P13639	EEF2, EF2
P13797	PLS3
P14618	PKM
P14735	IDE
P14923	JUP
P15259	PGAM2
P15924	DSP
P17931	LGALS3
P18206	VCL
P19971	TYMP
P21281;P15313	ATP6V1B2;ATP6V1B1
P22392;O60361	NME2;NME2P1
P22735	TGM1
P23396	RPS3
P23526	AHCY
P25311	AZGP1
P25705	ATP5A1
P25786	PSMA1
P25787	PSMA2
P25788	PSMA3
P25789	PSMA4
P26641	EEF1G, EF1G
P27482	CALML3
P28070	PSMB4
P28072	PSMB6
P28074	PSMB5
P29508	SERPINB3

Annexes

P20340	RAB6A, RAB6
P14625	HSP90B1
Q9HCJ6	VAT1L
P55084	HADHB
P55072	VCP
Q6PIU2	NCEH1
P62937	PPIA
Q13423	NNT
P21912	SDHB, SDH, SDH1
Q16720	ATP2B3
P00367	GLUD1
P22694	PRKACB
P10809	HSPD1, HSP60
A1L157	TSPAN11
P50395	GDI2
P60953	CDC42
P09622	DLD
P04075	ALDOA, ALDA
P55786	NPEPPS
P51572	BCAP31
Q14195	DPYSL3
P07900	HSP90AA1
Q01484	ANK2, ANKB
Q9Y4L1	HYOU1
Q9H330	TMEM245
P62166	NCS1
O94760	DDAH1
Q6YP21	KYAT3
Q9HBL0	TNS1, TNS
Q14204	DYHC1
P11021	HSPA5G, RP78
P04075	ALDOA, ALDA
Q00765	REEP5
P49411	TUFM
P55786	NPEPPS
P30042	C21orf33HES1KNPI
P35580	MYH10
Q9BWD1	ACAT2
P35611	ADD1, ADDA
P11216	PYGB
P48602	Vha68-1
P22303	ACHE
Q9H4M9	EHD1
P35573	AGL
P34897	SHMT2

P30041	PRDX6
P30086	PEBP1
P31151	S100A7
P31943;P52597	HNRNPH1
P31944	CASP14
P31946	YWHAB
P31947	SFN
P34931	HSPA1L
P35579	MYH9
P35908	KRT2
P36952	SERPINB5
P37837	TALDO1
P38606	ATP6V1A
P40121	CAPG
P40926	MDH2
P42357	HAL
P46940	IQGAP1
P47929	LGALS7
P48594	SERPINB4
P49189	ALDH9A1
P49327	FASN
P49368	CCT3
P49721	PSMB2
P50395;P31150	GDI2;GDI1
P50452	SERPINB8
P51149	RAB7A
P51659	HSD17B4
P52907	CAPZA1
P55072	VCP
P58107	EPPK1
P59998	ARPC4
P60174	TPI1
P60709;P63261	ACTB;ACTG1
P60842;Q14240	EIF4A1;EIF4A2
P61158;Q9P1U1	ACTR3;ACTR3B
P61626	LYZ
P61803	DAD1
P61981	YWHAG
P62258	YWHAE
P63104	YWHAZ
P68133;P68032; P63267;P62736	ACTA1;ACTC1; ACTG2;ACTA2
Q5VTE0;P68104	EEF1A1P5;EEF1A1
P68366	TUBA4A
P68371	TUBB4B
P68871	HBB

Annexes

P30038	ALDH4
Q14254	FLOT2
Q9H4B7	TUBB1
Q02978	SLC25A11
P11217	PYGM
Q16720	ATP2B3
P07954	FH
Q8NF91	SYNE1
P02549	SPTA1, SPTA
Q9P2R7	SUCLA2
P31040	SDHA, SDH2, SDHF
Q00610	CLTC
P17858	PFKL
Q13813	SPTAN1
P17858	PFKL
P02549	SPTA1, SPTA
P52789	HK2
P68032	ACTC1
P28838	LAP3
P56134	ATP5J2
P98164	LRP2
Q9Y4W6	AFG3L2
Q12955	ANK3
Q9P2R7	SUCLA2
O75131	CPNE3
Q9HAV0	GNB4
Q68DQ2	CRYBG3
Q13813	SPTAN1
Q9NZZ1	CALML5
P11217	PYGM
P05026	ATP1B1, ATP1B
P31040	SDHA, SDH2, SDHF
P15531	NME1
P62826	RAN
Q16620	NTRK2, TRKB
P35232	PHB
P49448	GLUD1
Q68DQ2	CRYBG3
P62258	YWHA
Q8WWI5	SLC44A1
P40926	MDH2
Q9P2R7	SUCLA2
P27216	ANXA13, ANX13
P02549	SPTA1, SPTA
Q9Y3R4	NEU2

P69905	HBA1
P80188	LCN2
P81605	DCD
P84085	ARF5
Q00610	CLTC
Q00796	SORD
Q01469	FABP5
Q02413	DSG1
Q02878	RPL6
Q05639	EEF1A2
Q06830	PRDX1
Q07065	CKAP4
Q08188	TGM3
Q08554	DSC1
Q09666	AHNAK
Q13813	SPTAN1
Q13835	PKP1
Q13867	BLMH
Q14204	DYNC1H1
Q14574	DSC3
Q15149	PLEC
Q15517	CDSN
Q16610	ECM1
Q5T749	KPRP
Q5T750	XP32
Q6UWP8	SBSN
Q6ZVX7	NCCRP1
Q71U36	TUBA1A
Q7Z406	MYH14
Q86SG5	S100A7A
Q8IW75	SERPINA12
Q8WVV4	POF1B
Q92817	EVPL
Q96P63	SERPINB12
Q96QA5	GSDMA
Q9BQE3	TUBA1C
Q9H0E2	TOLLIP
Q9HCY8	S100A14
Q9NZH8	IL36G
Q9NZZ1	CALML5
Q9UI42	CPA4
Q9UIV8	SERPINB13
Q9UJ70	NAGK
Q9UKQ9	KLK9
Q9Y251	HPSE

Tableau supplémentaire 7 : contenu protéique F7

Proteins IDs	Gens names
P41732	TSPAN7A
Q86YT5	SLC13A5
P42765	ACAA2
Q9NZM1	MYOF
Q9H0C2	SLC25A31
P61601	NCALD
Q9Y2M2	SSUH2
P04406	GAPDH
P06576	ATP5B
P55087	AQP4
Q16891	IMMT
P00505	GOT2
P40926	MDH2
P80404	ABAT
O75311	GLRA3
P62987	UBA52
Q14764	MVPLRP
P28331	NDUFS1
P30531	SLC6A1
O95202	LETM1
P40926	MDH2
Q9H4M9	EHD1
O43301	HSPA12A
P32119	PRDX2
A6NGN9	IGLON5
P25705	ATP5F1A
P05091	ALDH2
P14618	PKM
P11277	SPTB, SPTB1
P36542	ATP5F1C
P40925	MDH1
P14625	HSP90B1
Q13423	NNT
P21912	SDHB, SDH, SDH1
Q16720	ATP2B3
P00367	GLUD1
P10809	HSPD1, HSP60
P50395	GDI2
P09622	DLD
P04075	ALDOA, ALDA
P07900	HSP90AA1
Q01484	ANK2, ANKB
Q9VWH4	I(1)G0156

Proteins IDs	Gens names
Q9P2R7	SUCLA2
P27216	ANXA13, ANX13
P02549	SPTA1, SPTA
Q96E52	OMA1
P36957	DLST
P02549	SPTA1, SPTA
O14732	IMPA2
O14818;Q8TAA3	PSMA7;PSMA8
O60437	PPL
Q99880	HIST1H2BL
O75223	GGCT
P01876	IGHA1
P04040	CAT
P04075	ALDOA, ALDA
P04406	GAPDH
P05089	ARG1
P05109	S100A8
P06702	S100A9
P06733	ENO1
P07339	CTSD
P07355;A6NMY6	ANXA2;ANXA2P2
P0C0L5;P0C0L4	C4B;C4A
P11021	HSPA5G, RP78
P11142	HSPA8
P11217;P11216;P06737	PYGM;PYGB;PYGL
P12273	PIP
P13639	EEF2, EF2
P14923	JUP
P15924	DSP
P17066	HSPA6;HSPA7
P35325	SPRR2B
P22735	TGM1
P25311	AZGP1
P25788	PSMA3
P29508	SERPINB3
P31151	S100A7
P31944	CASP14
P35908	KRT2
P47929	LGALS7
P48643	CCT5
P60174	TPI1, TPI
P60709;P63261	ACTB;ACTG1
P61626	LYZ

Annexes

P15880	RPS2
Q14204	DYHC1
P11021	HSPA5G, RP78
P30042	C21orf33HES1KNPI
Q9BWD1	ACAT2
P11216	PYGB
Q14254	FLOT2
Q8NF91	SYNE1
P02549	SPTA1, SPTA
Q9P2R7	SUCLA2
P31040	SDHA, SDH2, SDHF
Q00610	CLTC
P02549	SPTA1, SPTA
Q9P2R7	SUCLA2
Q68DQ2	CRYBG3
Q13813	SPTAN1
P04406	GAPDH
Q96QA5	GSDMA

Q5VTE0;P68104	EEF1A1P5;EEF1A1
P81605	DCD
Q01469	FABP5
Q02413	DSG1
Q06830	PRDX1
Q08188	TGM3
Q08554	DSC1
Q13813	SPTAN1
Q13835	PKP1
Q13867	BLMH
Q5T749	KPRP
Q5T750	XP32
Q6UWP8	SBSN
Q6ZVX7	NCCRP1
Q71U36	TUBA1A
Q8WVV4	POF1B
Q96P63	SERPINB12

Tableau supplémentaire 8 : contenu protéique F8

Proteins IDs	Gene names
P13637	AT1A3
P42892	ECE1
O15394	NCAM2, NCAM21
P20073	ANXA7
Q86YT5	SLC13A5
Q16851	UGP2UGP1
Q9ULD0	OGDHL
P06576	ATP5B
P00505	GOT2
P40926	MDH2
P80404	ABAT
P11142	HSPA8
P04179	SOD2
Q4KMG0	CDON
Q9H4M9	EHD1
P30101	PDIA3
P25705	ATP5A1
P42892	ECE1
P11277	SPTB, SPTB1
P40925	MDH1
P62805	HIST1H4A
P15104	GLUL
P34059	GALNS
Q13423	NNT

Proteins IDs	Gene names
Q68DQ2	CRYBG3
P31040	SDHA, SDH2, SDHF
P27216	ANXA13, ANX13
P02549	SPTA1, SPTA
P36957	DLST
P02549	SPTA1, SPTA
O75223	GGCT
O75342	ALOX12B
P04040	CAT
P04075	ALDOA, ALDA
P04406	GAPDH
P05089	ARG1
P05109	S100A8
P06702	S100A9
P07339	CTSD
P07355;A6NMY6	ANXA2;ANXA2P2
P11217;P11216;P06737	PYGM;PYGB;PYGL
P12273	PIP
P14923	JUP
P15924	DSP
P22735	TGM1
P25311	AZGP1
P29508	SERPINB3
P31151	S100A7

Annexes

P08758	ANXA5	P31944	CASP14
P00352	ALDH1A1	P35908	KRT2
P00367	GLUD1	P47929	LGALS7
P10809	HSPD1, HSP60	P60709;P63261	ACTB, ACTG1
P09622	DLD	P60900	PSMA6
Q2Y0W8	SLC4A8	Q5VTE0;P68104	EEF1A1P5;EEF1A1
P11021	HSPA5G, RP78	P81605	DCD
P11277	SPTB, SPTB1	Q01469	FABP5
Q62433	Ndrp1	Q02413	DSG1
P11216	PYGB	Q06830	PRDX1
P11277	SPTB, SPTB1	Q08188	TGM3
P02549	SPTA1, SPTA	Q08554	DSC1
Q9P2R7	SUCLA2	Q13835	PKP1
P31040	SDHA, SDH2, SDHF	Q5T749	KPRP
P02549	SPTA1, SPTA	Q5T750	XP32
Q9P2R7	SUCLA2	Q6UWP8	SBSN
Q96QA5	GSDMA	Q96P63	SERPINB12

Tableau supplémentaire 9 : contenu protéique culot-UC

Protein IDs	Gene name	Protein IDs	Gene name
P49961	ENTP1	P40925	MDH1
P61764	STXB1	O75131	CPNE3
P21333	FLNA	O15484	CAPN5
P16870	CPE	Q01362	MS4A2
P20073	ANXA7	P05023	AT1A1
O95299	NDUFA10	P15104	GLUL
P13637	AT1A3	P36871	PGM1
Q15181	PPA1	Q2Y0W8	SLC4A8
P41732	TSPAN7	P34059	GALNS
Q8N0X4	CLYBL	P20340	RAB6A
P38646	HSPA9	P14625	HSP90B1
P42892	ECE1	Q92597	NDRG1
P22695	UQCRC2	Q9HCJ6	VAT1L
O15394	NCAM2	P55072	VCP
P20073	ANXA7	P20073	ANXA7
Q86YT5	SLC13A5	Q6PIU2	NCEH1
P57103	SLC8A3	P62937	PPIA
Q9NZM1	MYOF	Q13423	NNT
P51649	ALDH5A1	P08758	ANXA5
P62166	NCS1	P00352	ALDH1A1
P40939	HADHA	P21912	SDHB
P08236	GUSB	Q16720	ATP2B3
O00217	NDUFS8	P00367	GLUD1
Q9ULP0	NDRG4	P10809	HSPD1
A0FGR8	ESYT2	P54819	AK2

Annexes

Q9H0C2	SLC25A31
Q16851	UGP2
P35612	ADD2
Q9ULD0	OGDHL
P08559	PDHA1
P48728	AMT
P60709	ACTB
P50148	GNAQ
P20336	RAB3A
P54920	NAPA
Q12955	ANK3
P49257	LMAN1
Q9HAV0	GNB4
P61601	NCALD
Q5R3I4	TTC38
P48163	ME1
Q9Y2M2	SSUH2
P19021	PAM
Q96FN4	CPNE2
Q8WWF8	CAPSL
Q6P1M3	LLGL2
P04406	GAPDH
P35241	RDX
P60174	TPI1
P06576	ATP5B
P62258	YWHAE
P48058	GRIA4
Q9UBV8	PEF1
P56556	NDUFA6
P15531	NME1
Q16849	PTPRN
P21796	VDAC1
Q9HBH5	RDH14
Q16891	IMMT
P00505	GOT2
P40926	MDH2
O75311	GLRA3
P06733	ENO1
P27348	YWHAQ
P62987	UBA52
Q6KCM7	SLC25A25
Q14764	MVP
P11142	HSPA8
P28331	NDUFS1
P27797	CALR
P13637	AT1A3

P12694	BCKDHA
P61421	ATP6V0D1
P06744	GPI
P05023	ATP1A1
P50395	GDI2
P60953	CDC42
P61224	RAP1B
P09471	GNAO1
P49821	NDUFV1
P09622	DLD
Q9Y2Q0	ATP8A1
P04075	ALDOA
P24539	ATP5F1
Q99643	SDHC
Q9P0J0	NDUFA13
P16519	PCSK2
P21281	ATP6V1B2
Q14195	DPYSL3
P07900	HSP90AA1
P48595	SERPINB10
Q01484	ANK2
O75964	ATP5L
P59998	ARPC4
Q8NBX0	SCCPDH
P05771	PRKCB
P62166	NCS1
O75439	PMPCB
O94760	DDAH1
P13861	PRKAR2A
P09923	ALPI
P27824	CANX
Q86Y39	NDUFA11
Q2Y0W8	SLC4A8
P11021	HSPA5
Q6NUK1	SLC25A24
P11277	SPTB
P49411	TUFM
P55786	NPEPPS
Q68DQ2	CRYBG3
Q96AN5	TMEM143
P48047	ATP5O
O75947	ATP5H
O94868	FCHSD2
P11216	PYGB
Q9H4M9	EHD1
Q14254	FLOT2

Annexes

P30531	SLC6A1
O95202	LETM1
Q9Y334	VWA7
Q8N3J6	CADM2
Q9NY65	TUBA8
Q9Y305	ACOT9
P04179	SOD2
Q9H4G0	EPB41L1
Q68FR2	Bin2
O15394	NCAM2
Q99798	ACO2
P40926	MDH2
O60635	TSPAN1
Q8NDA2	HMCN2
O43252	PAPSS1
P50993	ATP1A2
Q9H4M9	EHD1
P30101	PDIA3
O00533	CHL1
O43301	HSPA12A
P18206	VCL
P05023	ATP1A1
P43034	PAFAH1B1
P32119	PRDX2
Q6ZMR3	LDHAL6A
Q06830	PRDX1
P61026	RAB10
Q00325	SLC25A3
O75251	NDUFS7
Q16795	NDUFA9
A6NGN9	IGLON5
P25705	ATP5F1A
P42892	ECE1
Q9UL45	BLOC1S6
Q9H3G5	CPVL
P43004	SLC1A2
P53597	SUCLG1
P21579	SYT1
P11177	PDHB
O75489	NDUFS3
P10515	DLAT
Q8NFI4	ST13P5
Q9NZT1	CALML5
O75955	FLOT1
O14880	MGST3
P14415	AT1B2

Q13748	TUBA3D, TUBA3C
O95834	EML2
P13693	TPT1
Q02978	SLC25A11
P11217	PYGM
Q02978	SLC25A11
Q8NF91	SYNE1
P02549	SPTA1
Q9P2R7	SUCLA2
P31040	SDHA
Q00610	CLTC
Q6UXV4	APOOL
P00441	SOD1
P02549	SPTA1SPTA
P56134	ATP5J2
P09471	GNAO1
Q9P2R7	SUCLA2
Q9HAV0	GNB4
Q68DQ2	CRYBG3
Q13813	SPTAN1
Q9NZT1	CALML5
P47985	UQCRRF51
P05026	ATP1B1
P31040	SDHASDH2
P15531	NME1
Q9Y281	CFL2
Q16620	NTRK2
P35232	PHB
P40926	MDH2
Q9P2R7	SUCLA2
Q8WVQ1	CANT1
P27216	ANXA13
P02549	SPTA1
O60503	ADCY9
P36957	DLST
P45880	VDAC2
P07237	P4HB
P02549	SPTA1
P62258	YWHAE
P02545	LMNA
P02751	FN1
P02787	TF
P04114	APOB
P05109	S100A8
P06396	GSN
P06733;P13929;	ENO1, ENO3, ENO2

Annexes

P15259	PGAM2	P11217;P11216; P06737	PYGM, PYGB, PYGL
P08574	CYC1	P14735	IDE
P35613	BSG	P15259;P18669; Q8N0Y7	PGAM2, PGAM1, PGAM4
P07205	PGK2	P15924	DSP
P04350	TUBB4A	P35908	KRT2
P14618	PKM	P38606	ATP6V1A
P55087	AQP4	P60709;P63261; Q6S8J3,Q92193	ACTB, ACTG1, POTEE, Actin
P35611	ADD1	Q5VTE0; P68104	EEF1A1P5, EEF1A1
P19404	NDUFV2	P81605	DCD
Q9UHW9	SLC12A6	Q13813	SPTAN1
Q93050	ATP6V0A1	Q13835	PKP1
P11277	SPTB	Q13885;Q9BVA1	TUBB2A, TUBB2B

Tableau supplémentaire 10 : GO term ODG

Current Gene List: EV-positive fractions (F4, F5 and F6)
Current Background: Homo sapiens
548 DAVID IDs
126 chart records

Term	Count	P-Value
extracellular exosome	342	4,9E-158
myelin sheath	70	1,2E-66
cytosol	226	2,3E-43
extracellular matrix	53	6,7E-27
mitochondrion	112	1,8E-26
cell-cell adherens junction	54	6,4E-26
focal adhesion	58	4,0E-25
membrane	137	3,0E-20
melanosome	27	2,5E-18
nucleosome	24	8,8E-16
mitochondrial matrix	41	3,5E-15
cytoplasm	224	8,6E-14
proteasome core complex	12	1,9E-12
extracellular space	84	4,9E-12
nuclear nucleosome	15	7,6E-12
cell body	17	1,2E-11
mitochondrial inner membrane	41	5,7E-11
proteasome core complex, alpha-subunit complex	8	9,8E-11
desmosome	11	3,6E-10
zona pellucida receptor complex	8	4,3E-10
chaperonin-containing T-complex	8	4,3E-10

Annexes

proteasome complex	15	7,7E-10
cytoskeleton	33	1,7E-8
brush border	13	8,0E-8
blood microparticle	19	2,5E-7
mitochondrial nucleoid	11	3,4E-7
cell-cell junction	19	1,6E-6
actin filament	12	1,6E-6
perinuclear region of cytoplasm	38	1,3E-5
vesicle	15	1,4E-5
stress fiber	10	1,6E-5
cortical actin cytoskeleton	9	2,1E-5
actin cytoskeleton	19	4,2E-5
basolateral plasma membrane	17	4,6E-5
cytoplasmic ribonucleoprotein granule	7	5,1E-5
endocytic vesicle lumen	6	5,6E-5
extracellular vesicle	9	6,6E-5
muscle thin filament tropomyosin	4	8,4E-5
lipid particle	10	8,5E-5
lysosomal membrane	21	9,1E-5
fascia adherens	5	1,1E-4
intracellular ribonucleoprotein complex	14	1,1E-4
endoplasmic reticulum chaperone complex	5	1,7E-4
nucleus	189	2,0E-4
membrane raft	17	2,2E-4
cornified envelope	8	2,6E-4
mitochondrial membrane	11	2,9E-4
cortical cytoskeleton	6	2,9E-4
pyruvate dehydrogenase complex	4	4,0E-4
filopodium	9	7,9E-4
midbody	12	9,8E-4
hemidesmosome	4	1,1E-3
microtubule	20	1,2E-3
spectrin	4	1,6E-3
F-actin capping protein complex	4	1,6E-3
costamere	5	1,7E-3
myosin II filament	3	2,3E-3
mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	5	2,4E-3
sarcolemma	9	2,5E-3
neuron projection	16	2,8E-3
protein complex	23	2,9E-3
nuclear chromatin	14	3,0E-3
lateral plasma membrane	7	3,4E-3
ruffle	9	3,6E-3
cell periphery	6	4,3E-3
mitochondrial respiratory chain complex II, succinate dehydrogenase complex (ubiquinone)	3	4,5E-3

Annexes

eukaryotic translation elongation factor 1 complex	3	4,5E-3
plasma membrane	141	4,8E-3
lamellipodium	12	5,3E-3
Z disc	10	5,8E-3
oxoglutarate dehydrogenase complex	3	7,3E-3
intercalated disc	6	8,0E-3
cytoplasmic vesicle membrane	10	8,8E-3
filamentous actin	5	1,0E-2
phosphopyruvate hydratase complex	3	1,1E-2
clathrin coat of trans-Golgi network vesicle	3	1,1E-2
pseudopodium	4	1,1E-2
intermediate filament	9	1,4E-2
myosin II complex	3	1,5E-2
COP9 signalosome	5	1,6E-2
cell projection	7	1,8E-2
proton-transporting V-type ATPase, V1 domain	3	1,9E-2
spectrin-associated cytoskeleton	3	1,9E-2
T-tubule	5	2,1E-2
sarcomere	5	2,3E-2
82	3	2,5E-2
M band	4	2,5E-2
oligosaccharyltransferase complex	3	3,0E-2
apical plasma membrane	15	3,4E-2
smooth endoplasmic reticulum	4	3,5E-2
membrane coat	4	3,5E-2
uropod	3	3,6E-2
sodium:potassium-exchanging ATPase complex	3	3,6E-2
peroxisomal matrix	5	3,9E-2
cleavage furrow	5	4,1E-2
actomyosin	3	4,3E-2
endolysosome membrane	3	4,3E-2
Arp2/3 protein complex	3	4,3E-2
mitochondrial respiratory chain complex I	5	4,7E-2
axon	12	4,7E-2
myosin complex	5	5,0E-2
rough endoplasmic reticulum	5	5,3E-2
respiratory chain complex II	2	5,5E-2
actomyosin, actin portion	2	5,5E-2
proteasome storage granule	2	5,5E-2
intermediate filament cytoskeleton	5	5,7E-2
mitochondrial outer membrane	9	5,7E-2
cell	7	6,1E-2
dendritic spine	7	6,1E-2
endocytic vesicle	5	6,3E-2
intracellular membrane-bounded organelle	23	6,5E-2
clathrin-coated pit	5	6,7E-2

Annexes

peroxisome	7	7,1E-2
axolemma	3	7,2E-2
external side of plasma membrane	11	7,5E-2
cell-cell contact zone	3	8,0E-2
ciliary pocket membrane	2	8,1E-2
cuticular plate	2	8,1E-2
organelle membrane contact site	2	8,1E-2
Myb complex	2	8,1E-2
monomeric IgA immunoglobulin complex	2	8,1E-2
secretory dimeric IgA immunoglobulin complex	2	8,1E-2
secretory IgA immunoglobulin complex	2	8,1E-2
coated vesicle	2	8,1E-2
cell surface	22	8,2E-2
polysome	4	8,9E-2

Tableau supplémentaire 11 : GO term UC

Current Gene List: UC sample
Current Background: Homo sapiens
245 DAVID IDs
92 chart records

Term	Count	P-Value
myelin sheath	60	7,2E-73
extracellular exosome	140	3,8E-53
mitochondrion	72	8,4E-26
mitochondrial inner membrane	39	1,3E-20
mitochondrial matrix	30	2,9E-16
membrane	74	1,1E-14
melanosome	17	2,4E-13
extracellular matrix	22	3,3E-10
focal adhesion	25	3,3E-10
mitochondrial respiratory chain complex I	11	6,0E-10
plasma membrane	96	1,0E-9
cytosol	82	2,5E-9
mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	8	5,7E-9
cell-cell adherens junction	21	9,1E-9
extracellular vesicle	10	1,4E-8
basolateral plasma membrane	15	1,0E-7
sarcolemma	10	1,6E-6
sodium:potassium-exchanging ATPase complex	5	8,6E-6
T-tubule	7	8,8E-6
mitochondrial respiratory chain complex III	5	1,8E-5
cortical actin cytoskeleton	7	1,9E-5
apical plasma membrane	15	2,9E-5
pyruvate dehydrogenase complex	4	4,2E-5

Annexes

costamere	5	9,3E-5
protein complex	17	1,0E-4
caveola	7	2,0E-4
neuron projection	12	2,9E-4
intercalated disc	6	2,9E-4
mitochondrial nucleoid	6	2,9E-4
extracellular space	34	3,2E-4
cytoskeleton	15	3,7E-4
membrane raft	11	3,8E-4
intracellular membrane-bounded organelle	19	3,9E-4
mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)	4	4,4E-4
neuronal cell body	13	9,0E-4
lysosomal membrane	12	9,6E-4
proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	3	9,9E-4
mitochondrial respiratory chain complex II, succinate dehydrogenase complex (ubiquinone)	3	9,9E-4
endocytic vesicle lumen	4	1,1E-3
terminal bouton	6	1,3E-3
mitochondrial membrane	7	1,4E-3
oxoglutarate dehydrogenase complex	3	1,6E-3
phosphopyruvate hydratase complex	3	2,4E-3
chromaffin granule membrane	3	2,4E-3
axon	10	2,6E-3
M band	4	3,2E-3
sarcoplasm	3	3,4E-3
spectrin-associated cytoskeleton	3	4,5E-3
proton-transporting V-type ATPase, V1 domain	3	4,5E-3
cell surface	16	5,0E-3
spectrin	3	5,7E-3
vesicle	7	6,6E-3
perinuclear region of cytoplasm	17	7,5E-3
actin cytoskeleton	9	7,8E-3
endoplasmic reticulum chaperone complex	3	8,6E-3
dense core granule	3	8,6E-3
cell	6	9,9E-3
endosome membrane	8	1,1E-2
perikaryon	6	1,2E-2
dendrite	11	1,3E-2
mitochondrial respiratory chain	3	1,4E-2
cell-cell contact zone	3	2,0E-2
cell-cell junction	7	2,5E-2
respiratory chain complex II	2	2,6E-2
midbody	6	2,7E-2
respiratory chain	3	2,7E-2
endosome	8	2,8E-2

Annexes

early endosome	8	3,1E-2
synaptic vesicle	5	3,2E-2
neuromuscular junction	4	3,5E-2
endoplasmic reticulum lumen	7	4,0E-2
phagocytic vesicle membrane	4	4,1E-2
smooth endoplasmic reticulum	3	4,5E-2
intermediate-density lipoprotein particle	2	5,1E-2
microtubule	9	5,1E-2
lipid particle	4	5,5E-2
nuclear envelope	6	5,7E-2
postsynaptic membrane	7	5,8E-2
endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment	4	5,9E-2
Golgi apparatus	18	5,9E-2
intermediate filament	5	6,0E-2
proton-transporting two-sector ATPase complex	2	6,3E-2
Z disc	5	6,8E-2
COP9 signalosome	3	7,6E-2
axon cytoplasm	3	7,6E-2
cytoplasm	79	8,4E-2
dense body	2	8,8E-2
sarcomere	3	9,1E-2
ruffle membrane	4	9,1E-2
lysosomal lumen	4	9,9E-2
clathrin-sculpted gamma-aminobutyric acid transport vesicle membrane	2	9,9E-2
MICOS complex	2	9,9E-2

Tableau supplémentaire 12

ExoCarta microgliale commun avec ODG F4-F5-F6	Exclusives ExoCarta microgliale		Exclusives ODG F4-F5-F6			
GAPDH	SLC16A1	FCER1G	ENPEP	CCT6A	OGDH	RARS
YWHAH	EZR	CAP1	ENTPD1	CCT8	PDHA1	VWA5A
YWHAZ	ITGB2	RHOG	STXBP1	AGXT2	AMT	ATP5B
HSPA8	VTI1B	S100A10	FLNA	KIAA1161	ACTB	GRIA4
PKM	CD14	CD9	PCK2	HRAS	GNAQ	PANK4
ALDOA	LCP1	PDCD6IP	ADCY9	MYOF	ANK3	NME1
PGK1	LPL	CTSS	ESYT3	EPB41L1	GNB5	UCHL3
ENO1	CD63	RAB11B	ANXA7	TECR	NCALD	IMMT
ANXA2	CLIC4	ITGAM	ATP1A2	NRCAM	ACHE	GOT2
MYH9	CD74	LAMP2	PPA1	ITGA6	TTC38	MDH2
LGALS3	VTI1A	EIF3F	CAP2	ALDH8A1	ME1	TRPM2
YWHAB	GNAI2	CSTB	TSPAN7	NDRG3	SSUH2	CCT4
CAPG	ANPEP	BASP1	HSPA9	WDR1	PAM	ABAT

Annexes

IQGAP1	CFL1	SDCBP	MMEL1	SUGCT	CPNE2	ENO3
EIF4A2	ATP1A3	LAMP1	RAB2A	ESYT2	PARK7	ARRB1
	STX8	MFGE8	UQCRC2	GANAB	LLGL2	IDH2
	RAB11A	MYL6	NCAM2	SLC25A31	RPN1	SLCO4C1
	RAB29	CD81	SLC13A2	NT5E	RDX	UBA52
	MSN	PGAM1	ACAA2	GLUD2	MINPP1	AGL
	HSP90AA1	RAB8B	EHD3	UGP2	TPI1	MVP

Exclusives ODG F4-F5-F6 (suite)							
SLC3A1	ARL6IP1	MMP10	ANXA13	HIST1H2AK	DSG1	CENPA	PABPC1
NDUFS1	ANK2	NPEPPS	EEF1G	HIST1H2AL	TGM3	NDUFA7	PABPC1L2A
CALR	AQP4	BCAP31	DLST	HIST1H2AG	DSC1	NDUFS2	PABPC1L2B
GBE1	ADD1	ATP6V1B1	PAFAH1B3	HIST1H2AE	PKP1	HSD17B12	PABPC1L
PSMD1	RPN2	SERPINB1	UBA1	HIST1H2AB	BLMH	PSMA5	PABPC3
ALG11	SLC12A6	PSAP	TKT	H2AFX	PLEC	COPB2	PABPC4
CFAP58	GPD1	SCCPDH	HSPH1	ARG1	CDSN	LETM1	HARS
SLC6A1	SPTBN5	TMEM245	FBP1	S100A8	HIST2H2AC	SFXN1	HARS2
VWA7	MDH1	NCS1	UGT1A1	GSN	HIST2H2AA4	AFG3L2	PLS3
EHHADH	HMCN1	PDIA6	CLIC1	S100A9	HIST2H2AA3	SLC25A3	NME2
TUBA8	CPNE3	DDAH1	PSMA7	ENO2	KPRP	ALDH2	NME1-NME2
SOD2	HIST4H4	CANX	PSMA8	CTSD	C1orf68	NDUFS3	RPS3
EPB41L3	HIST2H4B	PLOD1	TGM5	PYGL	SBSN	VDAC2	PSMA1
ATP1B2	HIST1H4I	DYNC1H1	ACTN4	PIP	NCCRP1	OAT	PSMA2
ACO2	HIST1H4A	SLC4A10	ACTN1	RNH1	TUBA1A	ACADL	PSMA4
TSPAN1	HIST1H4D	HSPA5	ACTN2	EFTUD2	MYH14	HADHB	CALML3
CSE1L	HIST1H4F	ALDOB	PPL	PKLR	MYH11	ALDH4A1	PSMB4
EEF2	HIST1H4K	SPTBN1	HIST1H2BL	IDE	POF1B	TSPAN11	PSMB6
PAPSS1	HIST1H4J	REEP5	HIST1H2BM	JUP	ZG16B	ATP5F1	PSMB5
PRKACB	HIST1H4C	NDRG1	HIST1H2BN	CTNNB1	SERPINB12	SDHC	PRDX6
EHD1	HIST1H4H	AP2A2	HIST1H2BH	DSP	GSDMA	PMPCB	PEBP1
DPYSL3	HIST1H4B	ACAT2	HIST3H2BB	TYMP	TUBA1C	CCBL2	HNRNPH1
PDIA3	HIST1H4E	A2ML1	HIST2H2BF	ATP6V1B2	S100A14	TNS1	HNRNPF
NTRK2	HIST1H4L	ACLY	HIST2H2BE	TGM1	CALML5	TUFM	HNRNPH2
HSPA12A	HIST2H4A	PYGB	HIST1H2BD	AHCY	NAGA	KIF5B	S100A11
VCL	CAPN5	AP2B1	HIST1H2BG	AZGP1	PPP1CC	MYH10	TALDO1
TPM2	MS4A2	PITPNA	HIST1H2BF	YWHAQ	IDH3B	SHMT2	ALDH9A1
HYOU1	UNC93A	DNM1	HIST1H2BE	SERPINB3	GLB1L2	SLC25A11	FASN
LGR5	GLUL	FLOT2	HIST1H2BI	S100A7	EEF1B2	ATP5J2	PSMB2
PRDX3	PGM1	TUBB1	HIST1H2BC	CASP14	PHB2	FH	SERPINB8
GCLC	DARS	PYGM	HIST1H2BB	SFN	AKAP5	OMA1	RAB7A
YARS	GALNS	CCT2	HIST1H2BO	HSPA1L	CCT7	RDH14	HSD17B4
LDHB	RAB6A	SYNE1	HIST1H2BJ	KRT2	TARS	PSMD2	CAPZA1
PRDX1	GSTP1	LAP3	HIST1H2BK	SERPINB5	C21orf33	DDX3X	CAPZA2
IGLON5	HSP90B1	SPTA1	GGCT	HAL	ATP5O	IMPA2	EPPK1
FRRS1	VAT1L	CA12	ALOX12B	LGALS7	LTF	PHGDH	ARPC4

Annexes

ATP5A1	VCP	SUCLA2	LDHA	LGALS7B	KRT6B	KLK10	DAD1
GDI1	NCEH1	TCP1	LDHAL6A	SERPINB4	AMY1A	FLNB	YWHAG
PPIA	NNT	SDHA	LDHC	ACADVL	AMY1B	CLIC3	GNB2L1
PGD	GNAS	CLTC	PNP	ACTG1	AMY1C	ANXA1	HBB
ECE1	ALDH1B1	PFKL	PGK2	POTEE	AMY2B	SLC25A6	HBA1
CCT3	SDHB	SPTAN1	CSTA	EIF4A1	AMY2A	SLC25A5	HBA2
CPVL	ATP2B3	HK2	LMNA	ACTR3	VIM	SLC25A4	LCN2
SLC1A2	GLUD1	TMEM47	TFRC	ACTR3B	PSMA3	RPLP2	ARF4
SUCLG1	PRKACG	LRP2	CAT	LYZ	PRDX2	TPM3	SORD
PDHB	HSPD1	GNB4	HSPB1	ACTA1	CCT5	TPM4	RPL6
GARS	CHRNA5	CRYBG3	HIST1H2AJ	ACTC1	PSMA6	TPM1	EEF1A2
DLAT	GPI	ATP1B1	HIST1H2AH	ACTG2	H2AFV	CAPN1	CKAP4
FLOT1	FAAH2	LINGO4	H2AFJ	ACTA2	SLC25A10	IVL	AHNAK
ANXA4	GDI2	PPP2R1A	HIST1H2AC	EEF1A1	LRPPRC	RPSA	DSC3
PGAM4	CDC42	RAN	HIST2H2AB	DCD	DNPEP	ALDOC	ECM1
GLRA2	RAP1B	ATP6V1A	HIST3H2A	CLTCL1	L2HGDH	HSPA1A	S100A7A
BSG	GNAO1	SLC44A1	HIST1H2AD	FABP5	HADHA	HSPA1B	SERPINA12
TUBB	DLD	SARS	HIST1H2AI	KRT76	ZZEF1	TXN	EVPL
TOLLIP	CPA4	SERPINB13	NAGK	KLK9	HPSE	GDA	NEU2
IL36G							

Tableau supplémentaire 13

Voie de signalisation (interactôme)	<i>p</i> value
2-ketoglutarate dehydrogenase complex	<i>p</i> = 0.014
3' -UTR-mediated translational regulation	<i>p</i> = 0.308
a6b1 and a6b4 Integrin signaling	<i>p</i> < 0.001
Acetylcholine Neurotransmitter Release Cycle	<i>p</i> = 0.039
Activated TLR4 signalling	<i>p</i> < 0.001
Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	<i>p</i> = 0.228
Activation of Chaperones by ATF6-alpha	<i>p</i> < 0.001
Activation of Chaperones by IRE1alpha	<i>p</i> = 0.15
Activation of IRF3/IRF7 mediated by TBK1/IKK epsilon	<i>p</i> = 0.032
Adaptive Immune System	<i>p</i> < 0.001
Adherens junctions interactions	<i>p</i> = 0.093
ADP signalling through P2Y purinoceptor 1	<i>p</i> = 0.035
ALK1 pathway	<i>p</i> < 0.001
ALK1 signaling events	<i>p</i> < 0.001
Alpha4 beta1 integrin signaling events	<i>p</i> = 0.112
Alpha6Beta4Integrin	<i>p</i> < 0.001
Alpha9 beta1 integrin signaling events	<i>p</i> < 0.001
Amino acid synthesis and interconversion (transamination)	<i>p</i> = 0.035
Androgen-mediated signaling	<i>p</i> = 0.079
AndrogenReceptor	<i>p</i> = 0.032
Angiopoietin receptor Tie2-mediated signaling	<i>p</i> = 0.165
Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC	<i>p</i> = 0.003

Annexes

Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	p = 0.22
Antigen processing-Cross presentation	p = 0.038
AP-1 transcription factor network	p < 0.001
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Cyclin B	p = 0.076
APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	p = 0.226
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	p = 0.212
APC/C:Cdh1 mediated degradation of Cdc20 and other APC/C:Cdh1 targeted proteins in late mitosis/early G1	p = 0.22
APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins	p = 0.253
APC-Cdc20 mediated degradation of Nek2A	p = 0.079
APOBEC3G mediated resistance to HIV-1 infection	p = 0.018
Apoptosis	p < 0.001
Apoptotic cleavage of cell adhesion proteins	p < 0.001
Apoptotic cleavage of cellular proteins	p < 0.001
Apoptotic execution phase	p < 0.001
Arf6 downstream pathway	p < 0.001
Arf6 signaling events	p < 0.001
Arf6 trafficking events	p < 0.001
Asparagine N-linked glycosylation	p = 0.031
aspartate biosynthesis	p = 0.011
aspartate degradation II	p = 0.018
Assembly of the pre-replicative complex	p = 0.258
Assembly of the RAD50-MRE11-NBS1 complex at DNA double-strand breaks	p = 0.014
Assembly of Viral Components at the Budding Site	p < 0.001
Association of licensing factors with the pre-replicative complex	p = 0.053
ATM mediated phosphorylation of repair proteins	p = 0.021
ATM mediated response to DNA double-strand break	p = 0.021
ATM pathway	p < 0.001
ATR signaling pathway	p < 0.001
Atypical NF-kappaB pathway	p = 0.049
Aurora A signaling	p = 0.022
Autodegradation of Cdh1 by Cdh1:APC/C	p = 0.194
Autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1	p = 0.217
Axon guidance	p < 0.001
Basigin interactions	p = 0.032
BCR signaling pathway	p = 0.002
Beta1 integrin cell surface interactions	p < 0.001
Beta-catenin phosphorylation cascade	p = 0.025
Binding and entry of HIV virion	p = 0.007
BMP receptor signaling	p < 0.001
Calnexin/calreticulin cycle	p < 0.001
Canonical NF-kappaB pathway	p = 0.007
Canonical Wnt signaling pathway	p = 0.002
Cap-dependent Translation Initiation	p = 0.327
Caspase cascade in apoptosis	p < 0.001
Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins	p < 0.001

Annexes

CD28 co-stimulation	p < 0.001
CD28 dependent Vav1 pathway	p < 0.001
CD40/CD40L signaling	p = 0.001
Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	p = 0.22
CDC42 signaling events	p < 0.001
CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	p = 0.212
CDO in myogenesis	p = 0.083
CDT1 association with the CDC6:ORC:origin complex	p = 0.234
Cell Cycle Checkpoints	p = 0.347
Cell Cycle, Mitotic	p = 0.027
Cell death signalling via NRAGE, NRIF and NADE	p = 0.003
Cell junction organization	p = 0.22
Cell surface interactions at the vascular wall	p = 0.028
Cell-Cell communication	p < 0.001
Cell-cell junction organization	p = 0.15
Centrosome maturation	p = 0.002
Ceramide signaling pathway	p < 0.001
Chaperonin-mediated protein folding	p = 0.056
Chromosome Maintenance	p < 0.001
Circadian Clock	p = 0.109
Citric acid cycle (TCA cycle)	p = 0.066
Class I MHC mediated antigen processing & presentation	p = 0.006
Class I PI3K signaling events	p < 0.001
Class I PI3K signaling events mediated by Akt	p < 0.001
Clathrin derived vesicle budding	p < 0.001
C-MYB transcription factor network	p = 0.037
C-MYC pathway	p = 0.002
Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding	p = 0.053
Coregulation of Androgen receptor activity	p = 0.02
Costimulation by the CD28 family	p < 0.001
Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)	p = 0.214
CXCR3-mediated signaling events	p = 0.125
CXCR4-mediated signaling events	p < 0.001
Cyclin A:Cdk2-associated events at S phase entry	p = 0.277
Cyclin D associated events in G1	p = 0.106
Cyclin E associated events during G1/S transition	p = 0.245
Cytokine Signaling in Immune system	p = 0.005
Death Receptor Signalling	p = 0.046
Degradation of beta catenin	p = 0.063
Degradation of beta-catenin by the destruction complex	p = 0.03
Deposition of New CENPA-containing Nucleosomes at the Centromere	p < 0.001
Destabilization of mRNA by AUF1 (hnRNP D0)	p = 0.002
Destabilization of mRNA by KSRP	p = 0.066
Developmental Biology	p < 0.001
Diabetes pathways	p = 0.001
Direct p53 effectors	p = 0.013

Annexes

DNA Repair	p = 0.056
DNA Replication	p = 0.014
DNA Replication Pre-Initiation	p = 0.298
Dopamine Neurotransmitter Release Cycle	p = 0.032
Double-Strand Break Repair	p = 0.093
Downstream signal transduction	p = 0.03
Downstream signaling of activated FGFR	p = 0.212
Downstream TCR signaling	p = 0.109
Early Phase of HIV Life Cycle	p = 0.039
E-cadherin signaling events	p < 0.001
E-cadherin signaling in keratinocytes	p < 0.001
E-cadherin signaling in the nascent adherens junction	p < 0.001
Effects of Botulinum toxin	p = 0.032
EGF receptor (ErbB1) signaling pathway	p < 0.001
EGFR downregulation	p < 0.001
EGFR interacts with phospholipase C-gamma	p = 0.099
EGFR1	p = 0.002
EGFR-dependent Endothelin signaling events	p < 0.001
Endogenous TLR signaling	p < 0.001
Endosomal Sorting Complex Required For Transport (ESCRT)	p = 0.096
Endothelins	p < 0.001
Entry of Influenza Virion into Host Cell via Endocytosis	p = 0.007
EPHA2 forward signaling	p = 0.066
EPHB forward signaling	p = 0.134
Ephrin B reverse signaling	p = 0.102
EphrinA-EPHA pathway	p = 0.143
EphrinB-EPHB pathway	p = 0.02
EPO signaling pathway	p = 0.115
ErbB receptor signaling network	p < 0.001
ErbB1 downstream signaling	p < 0.001
ErbB2/ErbB3 signaling events	p = 0.128
ErbB4 signaling events	p = 0.109
ER-Phagosome pathway	p = 0.034
Eukaryotic Translation Elongation	p = 0.037
Eukaryotic Translation Initiation	p = 0.327
Eukaryotic Translation Termination	p = 0.256
Extrinsic Pathway for Apoptosis	p = 0.046
Fanconi anemia pathway	p = 0.159
Fanconi Anemia pathway	p = 0.076
FAS (CD95) signaling pathway	p < 0.001
Fc-epsilon receptor I signaling in mast cells	p = 0.02
FGF signaling pathway	p = 0.159
Folding of actin by CCT/TriC	p = 0.032
Formation and Maturation of mRNA Transcript	p = 0.487
Formation of a pool of free 40S subunits	p = 0.282
Formation of ATP by chemiosmotic coupling	p = 0.053

Annexes

FoxO family signaling	p < 0.001
FRS2-mediated cascade	p = 0.053
G alpha (q) signalling events	p = 0.351
G1 Phase	p = 0.106
G1/S DNA Damage Checkpoints	p = 0.239
G1/S Transition	p = 0.344
G2/M Transition	p = 0.005
GAB1 signalosome	p = 0.006
GABA synthesis, release, reuptake and degradation	p = 0.002
Gene Expression	p = 0.154
Gluconeogenesis	p = 0.069
Glucose metabolism	p = 0.121
glutamate degradation II	p = 0.011
Glutamate Neurotransmitter Release Cycle	p = 0.039
Glypican 1 network	p < 0.001
Glypican 3 network	p < 0.001
Glypican pathway	p < 0.001
GMCSF-mediated signaling events	p < 0.001
Golgi Associated Vesicle Biogenesis	p < 0.001
Golgi Cisternae Pericentriolar Stack Reorganization	p = 0.001
GP1b-IX-V activation signalling	p = 0.032
GPCR downstream signaling	p = 0.855
GRB2 events in EGFR signaling	p = 0.001
GRB2:SOS provides linkage to MAPK signaling for Integrins	p = 0.035
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	p = 0.31
guanosine nucleotides de novo biosynthesis	p = 0.049
Hedgehog signaling events mediated by Gli proteins	p = 0.159
Hemostasis	p < 0.001
HIF-1-alpha transcription factor network	p = 0.212
HIV Infection	p = 0.165
HIV Life Cycle	p = 0.31
HIV-1 Nef: Negative effector of Fas and TNF-alpha	p = 0.118
Homologous Recombination Repair	p = 0.076
Homologous recombination repair of replication-independent double-strand breaks	p = 0.076
Host Interactions of HIV factors	p = 0.091
Hypoxic and oxygen homeostasis regulation of HIF-1-alpha	p = 0.25
IFN-gamma pathway	p < 0.001
IGF1 pathway	p < 0.001
IL12-mediated signaling events	p = 0.06
IL1-mediated signaling events	p < 0.001
IL2 signaling events mediated by PI3K	p = 0.002
IL2 signaling events mediated by STAT5	p = 0.096
IL23-mediated signaling events	p = 0.023
IL2-mediated signaling events	p = 0.008
IL3-mediated signaling events	p < 0.001
IL4-mediated signaling events	p = 0.2

Annexes

IL5-mediated signaling events	p < 0.001
IL6-mediated signaling events	p = 0.012
IL8- and CXCR1-mediated signaling events	p = 0.005
IL8- and CXCR2-mediated signaling events	p = 0.007
IL8-mediated signaling events	p = 0.008
Immune System	p < 0.001
Influenza Infection	p = 0.002
Influenza Life Cycle	p = 0.001
Influenza Viral RNA Transcription and Replication	p = 0.298
Innate Immune System	p = 0.004
Insulin Pathway	p < 0.001
Insulin receptor signalling cascade	p = 0.183
Insulin Synthesis and Processing	p = 0.081
Insulin-mediated glucose transport	p = 0.005
Integration of energy metabolism	p = 0.258
Integration of provirus	p = 0.028
Integrin alphaIIb beta3 signaling	p = 0.069
Integrin cell surface interactions	p = 0.228
Integrin family cell surface interactions	p < 0.001
Integrin-linked kinase signaling	p < 0.001
Integrins in angiogenesis	p = 0.022
Interaction between L1 and Ankyrins	p < 0.001
Interferon alpha/beta signaling	p = 0.242
Interferon Signaling	p = 0.298
Interleukin receptor SHC signaling	p = 0.025
Interleukin-1 signaling	p = 0.009
Interleukin-2 signaling	p = 0.096
Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling	p = 0.005
Internalization of ErbB1	p < 0.001
IRAK2 mediated activation of TAK1 complex	p < 0.001
IRAK2 mediated activation of TAK1 complex upon TLR7/8 or 9 stimulation	p < 0.001
IRS-mediated signalling	p = 0.168
IRS-related events	p = 0.174
JNK signaling in the CD4+ TCR pathway	p = 0.01
KitReceptor	p = 0.016
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	p = 0.308
L1CAM interactions	p < 0.001
Lissencephaly gene (LIS1) in neuronal migration and development	p = 0.006
LKB1 signaling events	p < 0.001
Loss of Nlp from mitotic centrosomes	p = 0.001
Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome	p = 0.001
LPA receptor mediated events	p < 0.001
Lysine catabolism	p = 0.028
Lysosome Vesicle Biogenesis	p < 0.001
M Phase	p = 0.019

Annexes

M/G1 Transition	p = 0.298
Meiosis	p < 0.001
Meiotic Recombination	p < 0.001
Meiotic Synapsis	p < 0.001
Membrane Trafficking	p < 0.001
Mesenchymal-to-epithelial transition	p = 0.191
Metabolism	p = 0.009
Metabolism of amino acids and derivatives	p = 0.03
Metabolism of carbohydrates	p = 0.282
Metabolism of mRNA	p = 0.01
Metabolism of proteins	p = 0.002
Metabolism of RNA	p = 0.018
Minus-strand DNA synthesis	p = 0.004
Mitotic G1-G1/S phases	p = 0.397
Mitotic G2-G2/M phases	p = 0.005
Mitotic M-M/G1 phases	p = 0.011
Mitotic Prophase	p = 0.001
MRN complex relocalizes to nuclear foci	p = 0.014
mRNA Processing	p = 0.433
mRNA Splicing	p = 0.32
mRNA Splicing - Major Pathway	p = 0.32
mRNA Splicing - Minor Pathway	p = 0.14
mTOR signaling pathway	p < 0.001
MyD88 cascade initiated on plasma membrane	p = 0.001
MyD88 dependent cascade initiated on endosome	p = 0.001
MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane	p = 0.001
MyD88-independent cascade initiated on plasma membrane	p = 0.001
Myogenesis	p = 0.083
NADE modulates death signalling	p = 0.014
N-cadherin signaling events	p < 0.001
NCAM signaling for neurite out-growth	p < 0.001
Nectin adhesion pathway	p < 0.001
Negative regulation of FGFR signaling	p < 0.001
Negative regulators of RIG-I/MDA5 signaling	p = 0.005
Nephrin interactions	p < 0.001
Nephrin/Neph1 signaling in the kidney podocyte	p = 0.004
Neuronal System	p = 0.146
Neurotransmitter Release Cycle	p = 0.004
Neurotrophic factor-mediated Trk receptor signaling	p = 0.006
NFkB and MAP kinases activation mediated by TLR4 signaling repertoire	p = 0.016
NF-kB is activated and signals survival	p = 0.046
NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	p = 0.057
N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle	p < 0.001
NOD1/2 Signaling Pathway	p = 0.004
Noncanonical Wnt signaling pathway	p < 0.001
Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex	p = 0.313

Annexes

Nonsense Mediated Decay Independent of the Exon Junction Complex	p = 0.269
Nonsense-Mediated Decay	p = 0.313
Norepinephrine Neurotransmitter Release Cycle	p = 0.039
NRIF signals cell death from the nucleus	p = 0.049
Nucleosome assembly	p < 0.001
Nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor (NLR) signaling pathways	p = 0.01
Orc1 removal from chromatin	p = 0.258
Osteopontin-mediated events	p = 0.005
p38 MAPK signaling pathway	p < 0.001
p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	p < 0.001
p53 pathway	p = 0.031
p53-Dependent G1 DNA Damage Response	p = 0.228
p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint	p = 0.228
p53-Independent DNA Damage Response	p = 0.223
p53-Independent G1/S DNA damage checkpoint	p = 0.223
p63 transcription factor network	p = 0.315
p75 NTR receptor-mediated signalling	p = 0.009
p75(NTR)-mediated signaling	p < 0.001
p75NTR recruits signalling complexes	p = 0.046
p75NTR signals via NF-kB	p = 0.056
Packaging Of Telomere Ends	p < 0.001
PAR1-mediated thrombin signaling events	p < 0.001
PAR4-mediated thrombin signaling events	p = 0.053
PDGF receptor signaling network	p < 0.001
PDGFR-alpha signaling pathway	p = 0.073
PDGFR-beta signaling pathway	p < 0.001
Peptide chain elongation	p = 0.035
PERK regulated gene expression	p = 0.039
PI-3K cascade	p = 0.093
Plasma membrane estrogen receptor signaling	p < 0.001
Platelet activation, signaling and aggregation	p < 0.001
Platelet Aggregation (Plug Formation)	p = 0.099
Platelet degranulation	p = 0.005
PLK1 signaling events	p = 0.054
Plus-strand DNA synthesis	p = 0.004
Polo-like kinase signaling events in the cell cycle	p = 0.058
Post-translational protein modification	p = 0.063
Posttranslational regulation of adherens junction stability and disassembly	p < 0.001
Presenilin action in Notch and Wnt signaling	p = 0.012
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	p = 0.392
Protein folding	p = 0.096
Proteoglycan syndecan-mediated signaling events	p < 0.001
pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis	p = 0.049
pyrimidine ribonucleotides de novo biosynthesis	p = 0.039
pyrimidine ribonucleotides interconversion	p = 0.032

Annexes

Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle	p = 0.106
RAC1 signaling pathway	p = 0.168
Rap1 signalling	p = 0.035
Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes	p = 0.002
Recruitment of repair and signaling proteins to double-strand breaks	p = 0.028
Recycling pathway of L1	p = 0.109
Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation	p = 0.212
Regulation of Androgen receptor activity	p = 0.057
Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase	p = 0.245
Regulation of Apoptosis	p = 0.237
Regulation of beta-cell development	p = 0.322
Regulation of CDC42 activity	p < 0.001
Regulation of cytoplasmic and nuclear SMAD2/3 signaling	p < 0.001
Regulation of DNA replication	p = 0.272
Regulation of gene expression in beta cells	p = 0.298
Regulation of IFNA signaling	p = 0.128
Regulation of Insulin Secretion	p = 0.159
Regulation of mitotic cell cycle	p = 0.253
Regulation of mRNA Stability by Proteins that Bind AU-rich Elements	p < 0.001
Regulation of nuclear beta catenin signaling and target gene transcription	p = 0.001
Regulation of nuclear SMAD2/3 signaling	p < 0.001
Regulation of ornithine decarboxylase (ODC)	p = 0.223
Regulation of p38-alpha and p38-beta	p < 0.001
Regulation of RAC1 activity	p = 0.168
Regulation of RhoA activity	p = 0.168
Regulation of signaling by CBL	p = 0.021
Regulation of Telomerase	p = 0.025
Regulation of the Fanconi anemia pathway	p = 0.028
Removal of licensing factors from origins	p = 0.264
Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.	p = 0.28
Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	p = 0.009
Retrograde neurotrophin signalling	p = 0.039
Reverse Transcription of HIV RNA	p = 0.004
Rho GTPase cycle	p < 0.001
RhoA signaling pathway	p = 0.168
RIG-I/MDA5 mediated induction of IFN-alpha/beta pathways	p = 0.002
RNA Polymerase I Chain Elongation	p < 0.001
RNA Polymerase I Promoter Clearance	p < 0.001
RNA Polymerase I Promoter Opening	p < 0.001
RNA Polymerase I Transcription	p < 0.001
RNA Polymerase I, RNA Polymerase III, and Mitochondrial Transcription	p < 0.001
Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	p = 0.005
S Phase	p = 0.354
S1P1 pathway	p < 0.001
S1P2 pathway	p = 0.089

Annexes

S1P3 pathway	p = 0.099
salvage pathways of pyrimidine ribonucleotides	p = 0.053
SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21	p = 0.214
SCF-beta-TrCP mediated degradation of Emi1	p = 0.223
Serotonin Neurotransmitter Release Cycle	p = 0.032
SHC1 events in EGFR signaling	p = 0.001
SHC-mediated cascade	p = 0.021
SHC-mediated signalling	p = 0.046
SHC-related events	p = 0.056
Signal amplification	p = 0.056
Signal attenuation	p = 0.039
Signal regulatory protein (SIRP) family interactions	p = 0.039
Signal Transduction	p = 0.028
Signal transduction by L1	p = 0.007
Signaling by Aurora kinases	p = 0.048
Signaling by EGFR	p < 0.001
Signaling by FGFR	p = 0.005
Signaling by GPCR	p = 0.947
Signaling by Insulin receptor	p = 0.248
Signaling by Interleukins	p < 0.001
Signaling by PDGF	p = 0.032
Signaling by Rho GTPases	p < 0.001
Signaling by SCF-KIT	p = 0.212
Signaling by Wnt	p = 0.03
Signaling events mediated by focal adhesion kinase	p < 0.001
Signaling events mediated by HDAC Class I	p < 0.001
Signaling events mediated by HDAC Class II	p = 0.128
Signaling events mediated by HDAC Class III	p < 0.001
Signaling events mediated by Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-Met)	p < 0.001
Signaling events mediated by PTP1B	p = 0.015
Signaling events mediated by Stem cell factor receptor (c-Kit)	p = 0.171
Signaling events mediated by TCPTP	p = 0.043
Signaling events mediated by the Hedgehog family	p = 0.209
Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2	p < 0.001
Signaling events regulated by Ret tyrosine kinase	p = 0.002
Signaling mediated by p38-alpha and p38-beta	p < 0.001
Signalling by NGF	p = 0.002
Signalling to ERKs	p = 0.102
Signalling to RAS	p = 0.073
SOS-mediated signalling	p = 0.053
Sphingosine 1-phosphate (S1P) pathway	p < 0.001
Spry regulation of FGF signaling	p < 0.001
Stabilization and expansion of the E-cadherin adherens junction	p < 0.001
Stabilization of p53	p = 0.22
Stimulation of the cell death response by PAK-2p34	p = 0.011
superoxide radicals degradation	p = 0.018

Annexes

Switching of origins to a post-replicative state	p = 0.258
Syndecan-1-mediated signaling events	p < 0.001
Syndecan-2-mediated signaling events	p = 0.242
Syndecan-3-mediated signaling events	p = 0.059
Syndecan-4-mediated signaling events	p < 0.001
Synthesis of DNA	p = 0.325
TCA cycle variation III (eukaryotic)	p = 0.046
TCR signaling	p = 0.156
TCR signaling in na໿ve CD4+ T cells	p < 0.001
TCR signaling in na໿ve CD8+ T cells	p = 0.011
Telomere Maintenance	p < 0.001
TGF-beta receptor signaling	p < 0.001
TGFBR	p = 0.001
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	p = 0.067
Thrombin signalling through proteinase activated receptors (PARs)	p < 0.001
Thrombin/protease-activated receptor (PAR) pathway	p < 0.001
Thromboxane A2 receptor signaling	p < 0.001
Thromboxane signalling through TP receptor	p = 0.028
Tie2 Signaling	p = 0.063
TNF alpha/NF-kB	p < 0.001
TNF receptor signaling pathway	p < 0.001
TNF signaling	p = 0.025
Toll Like Receptor 10 (TLR10) Cascade	p = 0.001
Toll Like Receptor 2 (TLR2) Cascade	p = 0.002
Toll Like Receptor 3 (TLR3) Cascade	p = 0.001
Toll Like Receptor 4 (TLR4) Cascade	p < 0.001
Toll Like Receptor 5 (TLR5) Cascade	p = 0.001
Toll Like Receptor 7/8 (TLR7/8) Cascade	p = 0.001
Toll Like Receptor 9 (TLR9) Cascade	p = 0.002
Toll Like Receptor TLR1:TLR2 Cascade	p = 0.002
Toll Like Receptor TLR6:TLR2 Cascade	p = 0.002
Toll Receptor Cascades	p < 0.001
TRAF3-dependent IRF activation pathway	p = 0.035
TRAF6 mediated induction of NFkB and MAP kinases upon TLR7/8 or 9 activation	p = 0.001
TRAF6 Mediated Induction of proinflammatory cytokines	p = 0.014
TRAF6 mediated induction of TAK1 complex	p = 0.001
TRAF6 mediated IRF7 activation	p = 0.086
TRAF6 mediated NF-kB activation	p = 0.046
TRAIL signaling pathway	p < 0.001
Transcription	p < 0.001
trans-Golgi Network Vesicle Budding	p < 0.001
Translation	p = 0.066
Transmission across Chemical Synapses	p = 0.07
TRIF mediated TLR3 signaling	p = 0.001
Trk receptor signaling mediated by PI3K and PLC-gamma	p = 0.002
Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	p = 0.22

Annexes

Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D	p = 0.212
Ubiquitin-dependent degradation of Cyclin D1	p = 0.212
Uncoating of the HIV Virion	p = 0.004
Unfolded Protein Response	p = 0.002
Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPAR-mediated signaling	p < 0.001
Validated nuclear estrogen receptor alpha network	p = 0.206
Validated targets of C-MYC transcriptional activation	p = 0.003
Validated targets of C-MYC transcriptional repression	p = 0.203
Validated transcriptional targets of deltaNp63 isoforms	p = 0.206
VEGF and VEGFR signaling network	p < 0.001
VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium	p = 0.086
Vif-mediated degradation of APOBEC3G	p = 0.22
Viral dsRNA:TLR3:TRIF Complex Activates TBK1/IKK epsilon	p = 0.021
Viral mRNA Translation	p = 0.256
Virus Assembly and Release	p < 0.001
Vpu mediated degradation of CD4	p = 0.214
Wnt	p < 0.001
Wnt signaling network	p < 0.001

Tableau supplémentaire 14 détail résultats statistiques PC-12 : t-test

Unpaired t test	
P value	0.0040
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.934 df=4
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	3.177 ± 0.3737 N=3
Mean ± SEM of column B	15.12 ± 1.978 N=3
Difference between means	11.95 ± 2.013
95% confidence interval	6.357 to 17.54
R square	0.8980

Tableau supplémentaire 15 : détail résultats statistiques Neurones de sangsue : two way anova

Table Analyzed	Data 1			
Two-way ANOVA	Ordinary			
Alpha	0.05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	1.509	0.0642	ns	No
Row Factor	19.27	< 0.0001	****	Yes
Column Factor	3.229	0.0007	***	Yes

Compare cell means regardless of rows and columns				
Number of families	1			
Number of comparisons per family	15			
Alpha	0.05			
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6 days:Ctrl vs. 6 days:EVs	-20.75	-358.7 to 317.2	No	ns
6 days:Ctrl vs. 13 days:Ctrl	-250.3	-573.9 to 73.21	No	ns
6 days:Ctrl vs. 13 days:EVs	-516.2	-854.2 to -178.3	Yes	***
6 days:Ctrl vs. 20 days:Ctrl	-492.2	-815.7 to -168.6	Yes	***
6 days:Ctrl vs. 20 days:EVs	-888.2	-1226 to -550.3	Yes	****
6 days:EVs vs. 13 days:Ctrl	-229.6	-567.5 to 108.3	No	ns
6 days:EVs vs. 13 days:EVs	-495.5	-847.2 to -143.8	Yes	***
6 days:EVs vs. 20 days:Ctrl	-471.4	-809.3 to -133.5	Yes	***
6 days:EVs vs. 20 days:EVs	-867.5	-1219 to -515.7	Yes	****

13 days:Ctrl vs. 13 days:EVs	-265.9	-603.8 to 71.99	No	ns
13 days:Ctrl vs. 20 days:Ctrl	-241.8	-565.4 to 81.68	No	ns
13 days:Ctrl vs. 20 days:EVs	-637.9	-975.8 to -300.0	Yes	****
13 days:EVs vs. 20 days:Ctrl	24.07	-313.8 to 362.0	No	ns
13 days:EVs vs. 20 days:EVs	-372.0	-723.7 to -20.25	Yes	*
20 days:Ctrl vs. 20 days:EVs	-396.0	-734.0 to -58.12	Yes	**

Figure supplémentaire 1 : orthologues mammifères retrouvés dans la banque sangsue**CD9**

>hirmed1_2016_11_11_CDS_20212_168_nt;4-47,sp|P30409|CD9_CHLAE CD9 antigen OS=Chlorocebus aethiops GN=CD9 PE=2 SV=2:6-47(evalue: 0.0570688, aln_length: 44)

MSCGVTCARILLIAFTSVLSLVGLLILAAGLLTKFGSETILKPFPEKAFEGISSN

>hirmed1_2016_11_11_CDS_32885_678_nt;27-222,sp|P40241|CD9_RAT CD9 antigen OS=Rattus norvegicus GN=Cd9 PE=1 SV=2:23-216(evalue: 3.17178e-30, aln_length: 196)

MPEHGAHGYSIQCIMDAISSISNKNLLGCAMIGVGIWIKVHPETFSSATKDTQLEVIEK
DLSSYGFSNVGAYCLIVVGSFVMIVSFLGCCGAVKESQCMLGMFFMALFVIFSALVGIGI
YSIVMKEELKQEISKVLHKKLQDMKNDKSSPNVMKFIEQKFDCCGVDGGIEDFIEHSQCL
LGHEKQGCVKEKMYEKYSQNVIIAGVAVGIAAVLVCFRVVVCVKS

>hirmed1_2016_11_11_CDS_72719_291_nt;44-96,sp|P21926|CD9_HUMAN CD9 antigen OS=Homo sapiens GN=CD9 PE=1 SV=4:176-228(evalue: 1.57606e-05, aln_length: 53)

MLLQRTFLTISFIQLQAHYYIRHTLISKRCFEYYLNVNINITFFSSKGCARKLRDLLEGQ
ITLLGGVAIGIVVVKVLGLLALVLACSLRKEYQSV

CD63

>hirmed1_2016_11_11_CDS_01648_153_nt;14-44,sp|P08962|CD63_HUMAN CD63 antigen OS=Homo sapiens GN=CD63 PE=1 SV=2:53-83(evalue: 0.000348056, aln_length: 31)

MKGQSRSTLSFNQIPLLLITSGVFVASVFLGCCGACSESVCFGLFVGVA

>hirmed1_2016_11_11_CDS_14654_309_nt;4-75,sp|P28648|CD63_RAT CD63 antigen OS=Rattus norvegicus GN=Cd63 PE=1 SV=2:107-178(evalue: 7.29191e-12, aln_length: 72)

MTPFSFQIQNELADSMCKTIPNYNKTDVTVTNIIQEKLMMCCGVNNYTDWEDNEYLSRTD
SVPDSCCHNITKGCYKAVTSGGVNVYKDVSIYYHCYFTLIE

>hirmed1_2016_11_11_CDS_15222_702_nt;4-231,sp|P08962|CD63_HUMAN CD63 antigen OS=Homo sapiens GN=CD63 PE=1 SV=2:5-236(evalue: 3.15174e-23, aln_length: 228)

MTGGGVTCQAIVLTVFNVIQFLGWLLIAGAVTKVKAETPGGTTAGAAIFLIVIGCIL
VVVSIIIGCLGAWTKNFCLLVTFISIFTAIIIFLLVIALIVAFVGRSKTDELETGLKEMIQ
WNDTSEFEKMQSLVLKLNFKCCGIHNYTDWSLNRYSNPPSCCGSQDPTCNYNAT
IYKQGCKTFAVDALKHSLVIIGGIAAACAIVMFLAIFASAYMAHTIRGSYHAV

>hirmed1_2016_11_11_CDS_20696_336_nt;5-111,sp|P08962|CD63_HUMAN CD63 antigen OS=Homo sapiens GN=CD63 PE=1 SV=2:131-237(evalue: 2.10247e-12, aln_length: 107)

MIQWNDTSFAESMQSQFKCCGVNTYTDWNLNPKYNGTRTLPPSCCESHPGTCNYGDQTIY

KQGCKDVLVEAVNYFLVIIGAVTAACAIVLFLAIIAAACMAHSVRTSNYSV

>hirmed1_2016_11_11_CDS_46890_1674_nt;73-280,sp|P28648|CD63_RAT CD63 antigen OS=Rattus norvegicus GN=Cd63 PE=1 SV=2:8-197(evalue: 2.05812e-08, aln_length: 208)
MDLVGVEMPAEDLQIDEQSLNSRESEEYSNISREAENDDYNDIENPLNDESFEARFARLY
DLPLNAKESTTWKLISFINVLSMWCGVGSFAILVMYKNTDRYLRLVLENDNGHLIVILA
MIGATACTFLFGFLTWWASTRSKRGS MRFLIYVYLGWATGLMFVSIASLIVCVVVYSL
LARIFSSGFLVMMQKYKSDLNTRIVHALQADYRCCGNSNYTEWFSVDFSGEYRNTDIGF
PSSCCNIVQYSKNCVSKAAFMQANILTPYKLGCLNLIKAKYQSILKYLLAIFSIVILGD
CLGLSLTVSNIQASKLHDDFMASEKELLSLKFRDKEAKKTILYDKLQQLKFFTPLSP
ERSKEKDELKTSSNPKMPSMTKTNSDDGFSKAGFKKLKSLIRKSKFEPDTETLRPLVE
TSDVKVENGSTMSRIILFLNLLAFIISLMGVGYVAGKYRNYSYDFIDGYYGGVILLIT
VGVFVFTALISVAGMCWSVINILKIAQESLEVLHAYIWWTAGLFVMQICVILMANSASE
NIDDFKVFDFIKIIF

>hirmed1_2016_11_11_CDS_48893_840_nt;122-251,sp|P28648|CD63_RAT CD63 antigen OS=Rattus norvegicus GN=Cd63 PE=1 SV=2:115-229(evalue: 6.2017e-08, aln_length: 130)
MAFEESAQMSVVVVIKVLAIIFLLISVSSIAYGRFKEFHILLPKFDDGELLGYVVISG
FIGTIMEGYGSVVYYLQCDYALKPTIRPSIDILVVDVAMSLKFASSAVILFYCHLNSGY
MFSDGFFVAMSKYRTDEKIRSLLSVIHVTYGCCGNYNSEWYKVNWRASTSEHVVGFPES
CCNKMAAQTLDNMCIAEIPYQEMSKLLPTEVGCLELLRWYKFMFSLASLFSVVAFIQS
LSLILAGCIMSRTSNIHQDENELQLQHSAILQLLYRPDL

>hirmed1_2016_11_11_CDS_72183_291_nt;9-88,sp|P28648|CD63_RAT CD63 antigen OS=Rattus norvegicus GN=Cd63 PE=1 SV=2:87-168(evalue: 6.73667e-09, aln_length: 80)
MLNFLSLIGLFLFFVLFIVGIFLMGYRERLRALWMKVMRDAMKEYSVNLNTKVLVDKIQ
FEHRCCGAAGHEDWHKTPWLRSGTYPNDENYEDYLA

TSG101

>hirmed1_2016_11_11_CDS_48612_363_nt;1-119,sp|Q6IRE4|TS101_RAT Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Rattus norvegicus GN=Tsg101 PE=1 SV=1:1-119(evalue: 2.95487e-44, aln_length: 119)
MASHEAFLRAALAKYRYHEETKNEIMKIKSFSDLRPCTNNYVHNNNGSTEELVCLEGTIP
VTYKGVYINIPICIYLVLTHPYNPPIIYVKPTPSMQIKPGKHVDTSGRVYLPYLHEWKHV

>hirmed1_2016_11_11_CDS_48844_432_nt;4-143,sp|Q99816|TS101_HUMAN Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Homo sapiens GN=TSG101 PE=1 SV=2:250-390(evalue: 1.32348e-45, aln_length: 140)
MALKAEMLSKTTQEDLEKGRHKLDNMLERIEKEQSKLESMDRLQARDEEISKTLKMK
MSEEDLDDMINPTAPLYKQILNAYAEQSIDDAIYYLGEALRKEVIELDVFLKQVRELS
RKQFLRLMLINKCRHKAGLPEIY

>hirmed1_2016_11_11_CDS_49518_213_nt;1-57,sp|Q61187|TS101_MOUSE Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Mus musculus GN=Tsg101 PE=1 SV=2:131-186(evalue: 0.00150896, aln_length: 57)
MAIVFGEEPVPFARPPGAIQQRPPYPTNTAMPTPSFNRPYPYSTQSFYPTSTGFAQA
NAQGPFSELH

HSP70

hirmed1_2016_11_11_CDS_18531_861_nt;1-256,sp|O43301|HS12A_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Homo sapiens GN=HSPA12A PE=1 SV=2:441-674(evalue: 8.44528e-83, aln_length: 256)

MRLMPECMNRLFQPTLDNITVAIANVLNQPDVSGVKHIFLVGGFAESPMLQQEIRKNFAHQARILPTDVSILTILKGAVLYGIDP
SIVVIRKSRLTYGLGVNLRFVGGKHPESKKAMKDGVPWCVDVFDHLVLADQSVLGSVIRSYTPAGPSQKFSLFHIYCTENRDV
EYVTDNGVVKCGTLRLDLDDYQWELETSPSRPVSQNLHDAEASPVVDGSKRREIQARLTFGDTEIKIIALDVATGNVVRATLDFL
NNFTHERITHKEHDQASECKSATDDLNAS

Les cellules microgliales sont considérées comme les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC). De nombreuses études ont démontré que ces cellules sont activées et recrutées sur le site de lésion. Les cellules microgliales de sangsue présentent un mode d'activation et de migration similaires post lésion expérimentale du SNC. Cette activation est accompagnée d'une libération massive de vésicules extracellulaires (VEs). Les VEs sont de petites particules produites par la plupart des types cellulaires et sont présentes dans plusieurs liquides biologiques, notamment la salive, l'urine, le lait maternel, le plasma et le liquide céphalo-rachidien ... Leur taille varie entre 30 nm et 1 µm de diamètre. Selon leur origine cellulaire, deux populations principales ont été décrites. Les exosomes qui sont connus comme des vésicules d'origine endosomales et les microvésicules qui sont générées suite au bourgeonnement de la membrane plasmique.

Les travaux portent sur l'isolement de VEs libérées par des cellules microgliales en culture primaire. Chez la sangsue, ces dernières sont séparées des populations de neurones suite à la dissociation du SNC.

Après quatre jours de culture, les VEs des cellules microgliales ont été isolées du milieu et leur contenu protéique a été analysé par spectrométrie de masse.

D'autre part, les VEs isolées ont été également testées *in vitro* pour leur potentiel à induire une croissance neuritique à la fois sur les neurones de sangsue et des lignées cellulaires de neuroblastome de mammifères.

Mots clefs

Hirudo medicinalis, cellules microgliales, vésicules extracellulaires, contenu protéique, ultracentrifugation, Optiprep™, croissance neuritique.

In Mammals, microglial cells are considered as the resident immune cells in central nervous system (CNS). Many studies demonstrated that, after injury, these cells are activated and recruited at the lesion site. Leech microglia presents a similar pattern of microglial activation and migration upon experimental lesion of its CNS. This activation is associated with the release of a large amount of Extracellular Vesicles (EVs).

EVs are small particles produced by numerous cell types and found in several biological fluids including saliva, urine, breast milk, plasma and cerebrospinal fluid ... Their size fluctuates between 30 nm and 1 µm in diameter. Depending on their cell origin, two EVs populations are reported: exosomes are described to be endosomal vesicles, while microvesicles are generated after plasma membrane shedding.

The main goal of this work was to isolate microglia EVs released in primary culture. For this purpose, microglial cells were separated from neurons after leech CNS dissociation. After four days, EVs were isolated from conditioned medium and their protein content was investigated by mass spectrometry analyses.

In the other hand, EVs were assessed for their potential to induce neurite outgrowth on both leech neurons and mammal neuroblastoma cell lines.

Keywords

Hirudo medicinalis, microglia, extracellular vesicles, protein content, ultracentrifugation, Optiprep™, neurite outgrowth.