



Caractérisation des vésicules extracellulaires plasmatiques dans une cohorte de patients infectés par leVIH-1

Mémoire

Julien Vitry

Maîtrise en microbiologie et immunologie

Maitre ès science (M. Sc.)

Québec, Canada

© Julien Pierre Vitry, 2017

**Caractérisation des vésicules extracellulaires plasmatiques dans
une cohorte de patients infectés par le VIH-1**

Mémoire

Julien Vitry

Sous la direction de :

Caroline Gilbert, directrice de recherche

Résumé

Les vésicules extracellulaires (VE) jouent un rôle de communication intercellulaire pouvant réguler le système immunitaire. Les VE sont composées de différentes populations que l'on retrouve dans tous les fluides biologiques et constituent des biomarqueurs ainsi que des outils thérapeutiques dans diverses pathologies comme les cancers.

Une étude dans notre laboratoire a révélé le potentiel de biomarqueur des vésicules extracellulaires plasmatiques (VEsp) chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1). Cette étude a montré un enrichissement des VE acétylcholinestérase positive (AChE+) et des marqueurs protéiques de la population des exosomes chez les patients infectés. Nous avons proposé comme hypothèse que la population de VEsp AChE+ serait des exosomes et que cette population constituerait un meilleur biomarqueur de l'infection par le VIH-1 que l'ensemble des VE.

Les VEsp AChE+ d'une nouvelle cohorte de patients ont été caractérisées. Dans un premier temps, la purification des VEsp AChE+ a été optimisée afin de séparer les grosses vésicules des petites. Dans un deuxième temps nous avons validé que la population de VEsp AChE+ est une population homogène et spécifique dont le potentiel de biomarqueur de l'infection a été validé. Pour terminer la caractérisation de cette population, elle a été séparée dans un gradient de vélocité à l'iodixanol afin de valider que cette population de vésicules était des exosomes.

Ce projet a permis de valider que la population d'exosomes AChE+ purifiées et caractérisées dans une cohorte de patients atteints du VIH-1+, représente un biomarqueur de l'évolution de l'infection par le VIH-1.

Table des matières

Résumé	III
Table des matières	IV
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations	IX
Remerciements	XII
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine.....	1
1.2 Les vésicules extracellulaires.....	3
1.2.1 Les différentes populations de vésicules extracellulaires.....	4
1.2.1.1 Les microvésicules (MVs).....	5
1.2.1.2 Les exosomes.....	5
1.2.1.3 Les vésicules apoptotiques	6
1.2.1.4 Les sous populations de vésicules extracellulaires.....	7
1.2.2 Composition des VE.....	7
1.2.2.1 Protéique.....	8
1.2.2.2 Lipidique.....	9
1.2.2.3 Génomique	10
1.2.2.3.1 Contenu en ARN	10
1.2.2.3.2 Contenu en ADN.....	11
1.2.3 Fonction des VE	12
1.2.3.1 Régulation du système immunitaire	13
1.2.3.2 Présentation antigénique.....	15
1.2.4 Usages thérapeutiques des VE.....	18
1.2.5 VE et particules virales.....	19
1.2.6 Usages de biomarqueur	20
1.2.7 Méthodes de purifications et de caractérisation des VE.....	23
1.2.7.1 Centrifugation différentielle	23
1.2.7.2 Précipitation et immunocapture.....	24
1.2.7.3 Chromatographie (tamisage moléculaire)	25

1.2.7.4	Gradient de densité	26
1.2.7.5	Gradient de vitesse	26
Chapitre 2 Problématique, hypothèse de recherche et objectifs		27
2.1	Problématique	27
2.2	Hypothèse	27
2.3	Objectifs	27
Chapitre 3 Matériels et Méthodes		29
3.1	Cohorte	29
3.2	Réactifs et anticorps	29
3.2.1	Réactifs	29
3.2.2	Anticorps	30
3.3	Méthodes	30
3.3.1	Purification des VEsp	30
3.3.2	Mesure de l'activité acétylcholine estérase	30
3.3.3	Préparation de la courbe standard	31
3.3.4	Dosage des protéines	33
3.3.5	Mesure du rayon hydrodynamique	33
3.3.6	Gradient de vitesse à l'iodixanol	34
3.3.7	Immunobuvardage	34
Chapitre 4 Résultats		36
4.1	Purification des microvésicules et des exosomes	36
4.2	Potentiel biomarqueur des VEsp AChE+ dans l'infection par le VIH-1	37
4.3	Caractérisation des VEsp AChE+ par gradient de vitesse	42
Chapitre 5 Discussion		46
5.1	Caractérisation de la population d'exosomes AChE+	46
5.2	Exosomes AChE+ dans l'infection par le VIH-1	47
5.3	Les exosomes AChE+ dans différentes pathologies ou différents fluides	49
Chapitre 6 Conclusion		50
Annexe	51
Références	52

Liste des tableaux

Tableau 1. Données cliniques de la cohorte de patients atteints du VIH-1+ étudiée.	38
Tableau 2. Corrélation entre l'activité AChE des VEsp purifiées et les paramètres cliniques des patients.	41

Liste des figures

Figure 1. Évolution de la pathogénèse du VIH-1.	2
Figure 2. Représentation des différentes populations de vésicules dans le milieu extracellulaire.	5
Figure 3. Composition d'une vésicule extracellulaire.	12
Figure 4. Les vésicules extracellulaires et la régulation du système immunitaire.....	17
Figure 5. Schématisation du rôle de biomarqueur potentiel des VEsp dans l'infection par le VIH-1.....	22
Figure 6. Caractérisation de la courbe standard d'exosomes bovins.....	32
Figure 7. Comparaison entre les types de VEsp purifiées.	36
Figure 8. Caractérisation des VEsp dans les différents bras de la cohorte.	39
Figure 9. Caractérisation de l'activité AChE, de la concentration protéique et du rayon hydrodynamique des VEsp séparées dans les fractions du gradient de vitesse.....	43
Figure 10. Caractérisation des marqueurs protéiques des VEsp dans les fractions du gradient de vitesse.....	44
Annexe 1. Évaluation des exosomes AChE+ dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrites.....	51

Liste des abréviations

AChE : Acétylcholinestérase

ADAM-17 : *ADAM metallopeptidase domain 17*

ADN : Acide désoxyribonucléique

APOBEC3G : *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNt : ARN de transfert

ART : Antiretroviral therapy : Traitement sous antirétroviraux

ASP : *Antisense protein*

BALBc : Lignée de souris consanguine albinos

BCA : *Bicinchoninic acid assay*

BSA : *Bovine serum albumin*

CCR5 : *C-C chemokine receptor type 5*

Cellules NP69 : Cellules épithéliales humaines immortalisé

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CSF1 : Colony stimulating factor 1

C57BL/6 : Lignée de souris « *Black-6* »

CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*

DBA/2j : Lignée de souris « *dilute brown non-agouti* »

DNase : *Deoxyribonuclease*

EBV : Virus Epstein-Barr

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EGFRvIII : *Epidermal growth factor receptor variant III*

ELV : *Exosomes like vesicle*

EPS8L1 : *Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1*

EPS8L2 : *Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2*

ESCRT : *Endosomal sorting complexes required for transport*

Exob : Exosomes bovins

FasL : Fas ligand

FBS : *Fetal bovine serum*

Gag : *Group specific antigen*
GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
GPI : *Glycosylphosphatidylinositol*
GTPase : *Guanosine Triphosphate*
HDL : *High-Density Lipoprotein*
HEK 293 T : *Cellules embryonnaires de reins transformées avec l'antigène T*
HIF-1 α : *1-alpha Hypoxia Inducible*
HRP : *Horseradish peroxydase*
ICAM1 : *Intercellular adhesion molecule*
IFN : *Interféron*
IL : *Interleukines*
LAMP-2 : *Lysosomal-associated membrane protein-2*
LDL : *Low-density lipoprotein*
LFA-1 : *Lymphocyte function-associated antigen-1*
LMP1 : *Protéine latente membranaire du virus Epstein-Barr*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MCP : *Monocyte chemotactic protein*
Micro ARN : *Micro-acide ribonucléique*
MIF : *Macrophage migration inhibitory factor*
MMPs : *Métalloprotéinases de matrice*
MVs : *Microvésicules*
MVB : *Corps multivésiculaires*
Nef : *Negative regulatory factor*
NK : *Natural Killer*
NKG2D : *Natural Killer group 2D*
OA : *Ostéoarthrose*
PAR : *Polyarthrites rhumatoïde*
PBS : *Tampon phosphate salin*
PD-1 : *Progammed cells death*
PEG : *Polyéthylène glycol*
PSO : *Arthrites psoriasique*
PVDF : *Polyvinylidene difluoridede*

P815 (H-2d) : Cellules cancéreuses de mastocytome

RBL-2H3 : *Rat basophilic leukemia*

SB : *Sample buffer*

SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

Siglec1 : Sialic acid binding Ig-like lectin 1 (Sialoadhésine)

SNAREs : *Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*

TAM : *Tumor associated macrophage*

TBS : *Tris buffer saline*

TCR : *T cell receptor*

TGF β : *Transforming growth factor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

Tsg 101 : *Tumour susceptibility gene 101*

TS/A (H-2d) : cellules cancéreuses d'adénocarcinome

UTP : Uridine Triphosphate

VE : Vésicules extracellulaires

VEsp : Vésicules extracellulaires plasmiques

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Remerciements

Je remercie ma directrice de recherche D^{re} Caroline Gilbert, de m'avoir accueilli, formé et pour avoir partagé sa passion pour la recherche au sein de son laboratoire. Sa rigueur scientifique et sa supervision ont contribué à affiner mes compétences et mon esprit scientifique pendant ma maîtrise.

Je remercie également les membres de l'équipe : Sofiane Berrazouane, Audrey Hubert, Thy-René Nsimba Batomene, Alma Posvandzic, Caroline Subra, Myriam Vaillancourt. J'ai partagé ma formation avec plaisir avec chacun d'entre eux, et je remercie particulièrement Audrey Hubert pour sa patience colossale à m'écouter chanter (faux) pendant les longues heures de manipulations.

Je tiens à remercier ma famille de m'avoir soutenu et encouragé à distance. Ils seront toujours ma source d'inspiration et de motivation, et leur soutien inébranlable me touche énormément.

Je remercie Aurélie Louit pour son soutien quotidien et pour avoir partagé les bons moments comme les plus durs.

Je tiens à remercier le professeur Paul Naccache et la professeure Maria Fernandes pour avoir pris le temps d'évaluer mon mémoire.

Chapitre 1 Introduction

1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est le virus responsable du syndrome de l'immunodéficience humaine acquise (SIDA). Le VIH-1 possède une activité transcriptase inverse permettant de le classer dans la famille des *Retroviridae*, et le VIH cause une infection lente et chronique qui permet de le classer dans le genre *lentivirus* (Gonda, Wong-Staal et al. 1985, Sonigo, Alizon et al. 1985, Alizon and Montagnier 1986). Ce rétrovirus de 100 à 120 nm est enveloppé d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte. La capsid virale contient le génome composé de 2 ARN monocaténares de polarité positive. Les éléments de structure des particules virales sont codés par différents gènes, dont 3 principaux *gag*, *env* et *pol*. Le gène *gag* (*group specific antigen*) code pour les protéines *gag* formant la structure de base de la capsid (Scarlata and Carter 2003). Le gène *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe virale (Watts, Dang et al. 2009) à savoir la gp120, une sous-unité de surface, et la gp41, une sous unité membranaire nécessaire pour infecter les cellules hôtes grâce à son affinité pour le récepteur CD4 (Klatzmann, Barre-Sinoussi et al. 1984, Cicala and Arthos 2014). La transcriptase inverse est codée par le gène *pol*, elle rétrotranscrit l'ARN viral en ADN viral dans la cellule hôte (Dufour, El Dirani-Diab et al. 1998). La capsid contient également des gènes accessoires *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif*, *vpu* et tout récemment le dernier gène qui donne la protéine *antisense protein* (ASP) codée par le brin anti-sens vient d'être confirmé (Cassan, Arigon-Chifolleau et al. 2016).

Le VIH-1 est connu pour provoquer une gamme de dysfonctionnements du système immunitaire, menant à une maladie chronique et souvent à la mort en absence de traitement. Cette pathologie implique une baisse rapide du nombre de lymphocytes T CD4 (McCune 2001), lors de la phase primaire de l'infection. Pendant un certain temps, la charge virale est contrôlée grâce à la réponse des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Borrow, Lewicki et al. 1994). Par la suite cette réponse devient moins efficace et une évolution lente de la maladie s'installe, c'est la phase chronique. Lors de cette phase les lymphocytes T CD8 prolifèrent et arborent un phénotype épuisé, tandis que les lymphocytes T CD4 décroissent (Chun, Nickle et al. 2008, Lorenzo-Redondo, Fryer et al.

2016). Cette variation cellulaire décrite très tôt après la découverte de la maladie fait que le ratio lymphocytes T CD4/CD8 est encore aujourd'hui le biomarqueur de la pathogénèse du VIH-1 (Sainz, Serrano-Villar et al. 2013, Serrano-Villar and Deeks 2015). Lorsque le système immunitaire s'épuise, c'est la phase SIDA. Les lymphocytes T CD8 rentrent en sénescence et anergie (Day, Kaufmann et al. 2006, Trautmann, Janbazian et al. 2006) et la quantité de lymphocytes T CD4 devient faible. Le système immunitaire n'est plus capable de contrôler la charge virale qui augmente rendant ainsi le patient plus vulnérable aux infections opportunistes pouvant entraîner la mort (Boshoff and Weiss 2002). En résumé l'infection par le VIH-1 se déroule en 3 phases qui sont la primo-infection, la phase chronique et la phase déclarée dite SIDA tel qu'illustré dans la figure 1.

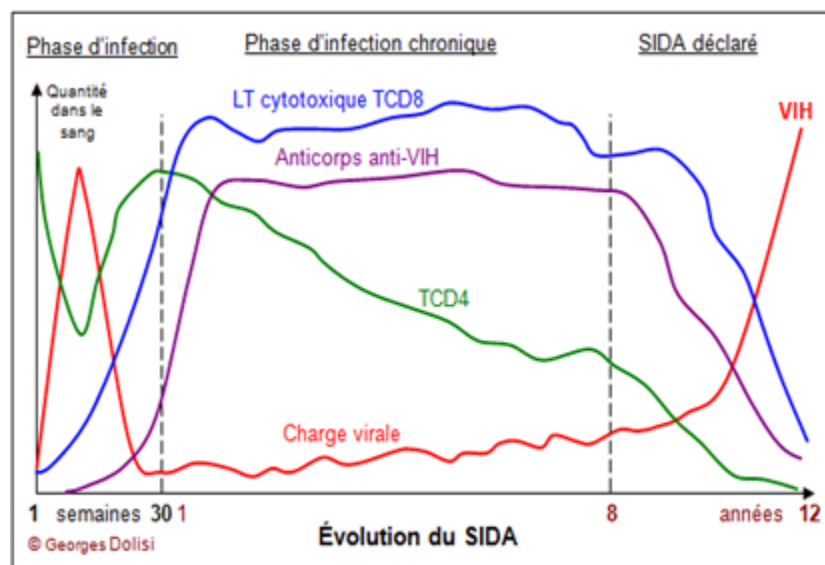


Figure 1. Évolution de la pathogénèse du VIH-1.

L'évolution de la pathologie du VIH-1 se déroule en 3 phases qui sont la primo-infection ; la phase d'infection chronique ; et la phase SIDA. (Adapté de <http://www.bio-top.net/>)

L'ensemble des réponses immunitaires est affecté de manière irréversible dès la phase de primo-infection due à la pathogénèse causée par le VIH-1 et ce jusqu'à l'épuisement de ce dernier. Il est nécessaire de bien caractériser les troubles causés par le VIH-1 sur le système immunitaire, car il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif à cette pathologie. Les thérapies aux antirétroviraux (ART) permettant de lutter contre cette infection ne sont pas accessibles à tous. Selon l'organisme de l'«ONUSIDA» sur les 36.9 millions de personnes vivant avec le VIH-1 en 2014, seulement 15.8 millions de personnes avaient accès aux

ART. Plusieurs études se sont intéressées au rôle des VE au cours de cette infection (Madison and Okeoma 2015). Afin d'améliorer notre compréhension des événements précoces associés aux dérégulations du système immunitaire et la pathogénèse de l'infection, nous avons porté notre attention vers l'étude des vésicules extracellulaires (VE) présentes dans le plasma des patients VIH-1. Ces VE pourrait en fait s'avérer être de bon biomarqueurs de l'état d'activation du système immunitaire au cours de l'infection par le VIH-1.

1.2 Les vésicules extracellulaires

C'est à partir de plusieurs lignées cellulaires que la sécrétion d'une population hétérogène de VE, ayant une activité 5'-nucléasique, a été mise en évidence par Trams, E.G. et al. (Trams, Lauter et al. 1981). Plus tard, la libération de vésicules par des réticulocytes, portant le récepteur de la transferrine, a été observée (Pan and Johnstone 1984). Il était alors connu que les corps multivésiculaires (MVB) fusionnaient avec les lysosomes, conduisant à la dégradation de leur contenu (Hershko and Ciechanover 1982, Pan and Johnstone 1984, Tanaka 1985). Grâce à la microscopie électronique la fusion entre les endosomes, comportant les MVB, et la membrane plasmique des réticulocytes ainsi que la libération dans le milieu extracellulaire de leur contenu a ainsi pu être mise en évidence (Harding, Heuser et al. 1983, Pan, Teng et al. 1985). C'est en 1987 que le terme « exosome » a été choisi pour désigner les vésicules extracellulaires ayant pour origine la voie d'endocytose (Johnstone, Adam et al. 1987). En 1996, les exosomes ont éveillé l'intérêt des chercheurs par la présence du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH-II) fonctionnel à leur surface. Les exosomes ont été découverts à partir de travaux sur des lymphocytes B, transformés par le virus Epstein-Barr (EBV) (Raposo, Nijman et al. 1996), et sur des cellules dendritiques de souris (Zitvogel, Regnault et al. 1998). Ces exosomes ont montré un rôle fonctionnel dans l'activation de lymphocytes T CD4 en arborant des molécules du CMH fonctionnelles, conférant des implications dans plusieurs processus biologiques comme la présentation antigénique et dans certaines pathologies comme les cancers et les pathogénèses des infections.

Les différentes populations de VE (Kowal, Arras et al. 2016), leurs compositions, leurs

fonctions et leurs potentiels théranostiques, ainsi que les différentes méthodes de précipitation seront abordés. La capacité des VE à réguler le système immunitaire peut les doter de rôles pro-viraux et anti-viraux dans l'infection par le VIH-1. Ainsi, en relation avec le rôle, la biodisponibilité et le contenu des VE, nous verrons que cela leur confèrent un potentiel de biomarqueur dans plusieurs pathologies (Thind and Wilson 2016) notamment le VIH-1 (Hubert, Subra et al. 2015). C'est dans ce contexte que l'objectif de ce mémoire s'insère, soit l'amélioration des méthodes de séparation des VE du plasma (VEsp) chez les patients VIH-1.

1.2.1 Les différentes populations de vésicules extracellulaires

Il existe plusieurs types de VE qui diffèrent selon la taille, la biogenèse et les fonctions (Figure 2). Plusieurs populations de VE ont été décrites, dont les principales étudiées sont les exosomes, les microvésicules (MVs) et les vésicules apoptotiques (Lobb, Becker et al. 2015). Les VE incluent aussi d'autres populations vésiculaires et des sous populations qui sont des vésicules dérivées de populations cellulaires spécifiques.

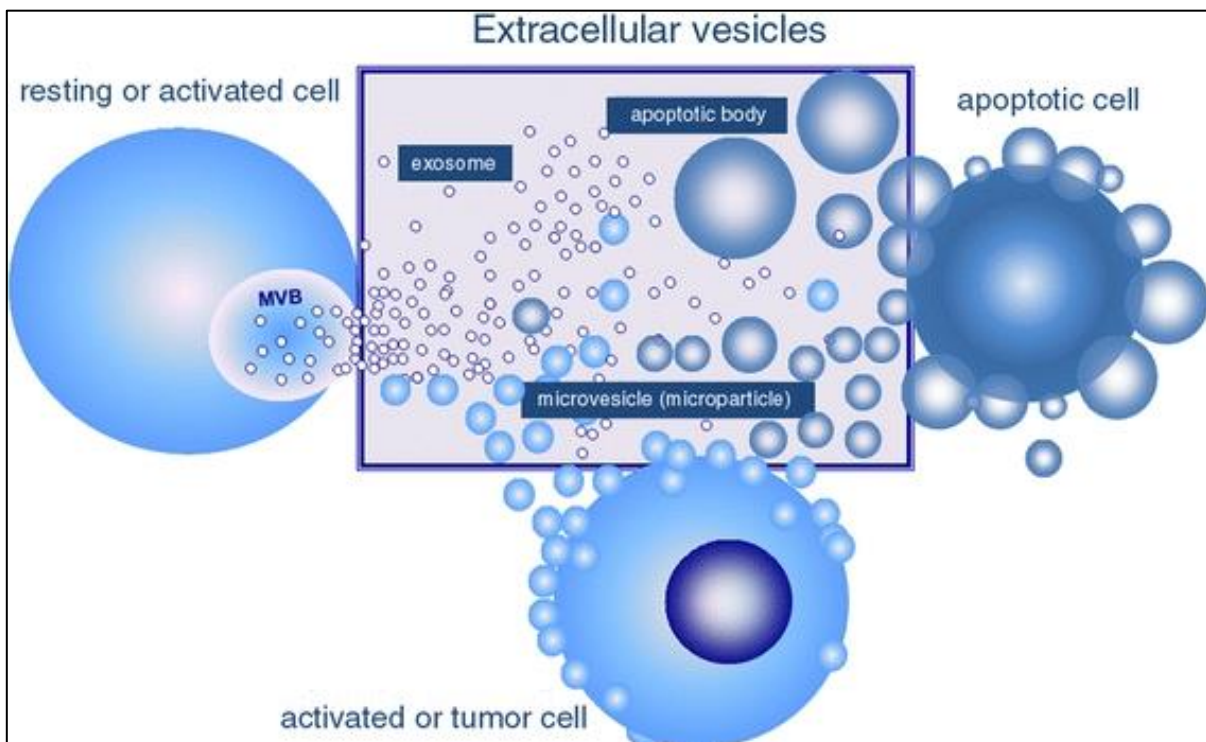


Figure 2. Représentation des différentes populations de vésicules dans le milieu extracellulaire.

Cette représentation illustre l'hétérogénéité des VE dans le milieu extracellulaire. On peut y retrouver différentes sous-populations de VE libérées par les cellules actives ou au repos, celles en apoptose ou encore les cellules tumorales. Tiré de (Gyorgy, Szabo et al. 2011).

1.2.1.1 Les microvésicules (MVs)

Les MVs possèdent des tailles hétérogènes comprises entre 100 et 1000 nm (Borges, Reis et al. 2013). Les MVs proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique, ainsi leur composition est similaire à la membrane plasmique et peut varier en fonction de la cellule d'origine (Booth, Fang et al. 2006). Les MVs peuvent dériver des cellules endothéliales, des plaquettes sanguines ou des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4, les macrophages et les cellules tumorales (Ismail, Wang et al. 2013).

1.2.1.2 Les exosomes

Les exosomes sont des vésicules de petite taille comprises entre 50 et 100 nm. Les exosomes proviennent du bourgeonnement de la membrane endosomale (vers l'intérieur de l'endosome) formant des vésicules intraluminales appelées également «corps multivésiculaires» (Denzer, Kleijmeer et al. 2000). Ensuite l'endosome va soit fusionner avec le lysosome formant l'endolysosome (Chen, Hui et al. 2013), ou bien fusionner avec la membrane plasmique libérant ainsi des vésicules appelées «exosomes» (Harding, Heuser et al. 1984, Pan, Teng et al. 1985, Raposo and Stoorvogel 2013). La sécrétion d'exosomes peut être spontanée ou induite selon le type cellulaire. Les réticulocytes (Pan, Teng et al. 1985), les lymphocytes T (Peters, Geuze et al. 1989, Blanchard, Lankar et al. 2002), les mastocytes (Raposo, Tenza et al. 1997), et les lymphocytes B au repos (Rialland, Lankar et al. 2006, Muntasell, Berger et al. 2007, Arita, Baba et al. 2008, Saunderson, Schuberth et al. 2008) sécrètent des exosomes en quantité détectable seulement après l'activation cellulaire (par exemple : activation par le TCR (*T Cell Receptor*) dans les cultures de lymphocytes T). Tandis que les lymphocytes B transformés avec l'EBV (Raposo, Nijman et al. 1996, Arita, Baba et al. 2008), les cellules dendritiques (Zitvogel, Regnault et al. 1998), et les macrophages (Bhatnagar, Shinagawa et al. 2007) sécrètent des exosomes de

manière constitutive *in vitro*, tout comme la plupart des lignées cellulaires tumorales (exemple : mélanome, carcinome, adénocarcinome etc..) (Wolfers, Lozier et al. 2001). Les complexes ESCRT-I, II et III (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) permettent la biogenèse, le recrutement et la séquestration des protéines ubiquitinyliées dans les exosomes (Schmidt and Teis 2012). Il est de plus en plus établi que le Tsg-101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*) représente un des marqueurs des exosomes (van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006, Kowal, Arras et al. 2016). Un autre marqueur, une enzyme, a été mis en évidence pour la première fois à partir d'exosomes provenant de réticulocytes, l'acétylcholinestérase (AChE) (Johnstone, Adam et al. 1987, Subra 2013). Depuis l'évaluation de l'activité de l'acétylcholinestérase est couramment utilisé dans l'analyse des exosomes (Savina, Vidal et al. 2002, Matsumoto, Kano et al. 2016). Récemment une équipe mis en avant une possible interaction inhibitrice de l'enzyme AChE entre les exosomes issues des fluides séminales et les virus du VIH-1 dans un modèle pré-incubatoire (Welch, Madison et al. 2017).

1.2.1.3 Les vésicules apoptotiques

Les vésicules apoptotiques sont libérées par des cellules en apoptose. Ces vésicules peuvent contenir du cytoplasme, des organites et de l'ADN fragmenté (Elmore 2007). Leur taille est approximativement comprise entre 800 nm et 5 µm (Hristov, Erl et al. 2004, They, Ostrowski et al. 2009). Les vésicules apoptotiques sont capables de transférer de l'ADN (Holmgren, Szeles et al. 1999) et ont montré un rôle dans les processus de migration et de différenciation cellulaire. Par exemple, les vésicules apoptotiques issues des cellules endothéliales sont capables d'induire la production de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) et d'interleukines (IL) 8 (Berda-Haddad, Robert et al. 2011). De plus, ces vésicules apoptotiques peuvent également activer la différenciation des cellules progénitrices des cellules endothéliales (Hristov, Erl et al. 2004). Les vésicules apoptotiques absorbées par les cellules phagocytaires peuvent présenter les épitopes de lymphocytes T (Bellone, Iezzi et al. 1997), et les antigènes de lymphocytes B (Cocca, Cline et al. 2002). Les vésicules apoptotiques ont une propriété immunogénique, elles peuvent induire une réponse lymphocyte T CD8 cytotoxiques (Black, Saunderson et al. 2016) et ont

montré pouvoir contribuer aux thérapies anti-cancers (Muhsin-Sharafaldine, Saunderson et al. 2016).

1.2.1.4 Les sous populations de vésicules extracellulaires

Dans les populations mineures des VE, sont retrouvées différentes structures membranaires. Des vésicules ressemblant aux exosomes appelées *exosomes like Vesicle* (ELV), sont des vésicules ayant la même origine que les exosomes; cependant, il leur manque des radeaux lipidiques, et leur taille ainsi que leurs propriétés de sédimentation se distinguent des exosomes (Islam, Jones et al. 2008, Théry, Ostrowski et al. 2009, Rivera, Cordero et al. 2010, Silverman and Reiner 2011). Les particules membranaires (Holme, Solum et al. 1994, Hess, Sadallah et al. 1999, Cocucci, Racchetti et al. 2009, Gyorgy, Szabo et al. 2011) sont des structures qui comprennent des fragments membranaires linéaires ou pliés, ainsi que des structures cellulaires provenant d'autres sources, y compris des lysosomes (Stinchcombe, Bossi et al. 2004) et des nanotubes (Davis 2007) sécrétés.

Certaines sous-populations de VE sont spécifiques à un type cellulaire. Le terme ectosome, quant à lui, est utilisé pour désigner les MVs dérivées des neutrophiles et des macrophages (Hess, Sadallah et al. 1999, Gasser and Schifferli 2004) et le terme dexosome pour des exosomes dérivés de cellules dendritiques (Zitvogel, Regnault et al. 1998, Besse, Charrier et al. 2016). Plus récemment une nouvelle population de grosses vésicules (1-10 μM) dérivées de cellules cancéreuses a été identifiée sous le terme d'oncosomes (Di Vizio, Kim et al. 2009, Aass, Ovstebo et al. 2011, Di Vizio, Morello et al. 2012, Minciacchi, You et al. 2015). D'autres vésicules associées à des cancers spécifiques sont retrouvées dans les fluides biologiques, par exemple les prostasomes sont des vésicules sécrétées par les cellules épithéliales de la prostate dans le cancer de la prostate (Aalberts, van Dissel-Emiliani et al. 2012, Skoczek, Nosek et al. 2016, Zijlstra and Stoorvogel 2016).

Ces populations de VE ainsi que les sous populations diffèrent par leur origine, leur biogénèse, leur taille, et leur composition. (Figure 3).

1.2.2 Composition des VE

1.2.2.1 Protéique

La composition protéique des VE, provenant de sources cellulaires différentes, a été déterminée par immunobuvardage (Raposo, Nijman et al. 1996, Raposo, Tenza et al. 1997, Escola, Kleijmeer et al. 1998, Zitvogel, Regnault et al. 1998, Wolfers, Lozier et al. 2001, Blanchard, Lankar et al. 2002), et par cytométrie en flux (Rabesandratana, Toutant et al. 1998, Clayton, Court et al. 2001, Thery, Boussac et al. 2001). De manière générale les VE sont enrichies en protéines membranaires qui sont connues pour se regrouper dans des microdomaines à la membrane plasmique ou aux endosomes. Les protéines membranaires incluent les tétraspanines (CD63, CD81, CD82, CD53 (*Cluster Differentiation*)), composées de 4 domaines transmembranaires (Hemler 2003), enrichies dans les endosomes (Escola, Kleijmeer et al. 1998). Des études ont également montré l'abondance de ces tétraspanines dans les VE de sources cellulaires différentes (Zoller 2009). Plusieurs protéines, et plus particulièrement celles du CMH-I, les tétraspanines, les annexines, les flotillines et les protéines chaperonnes HSP70 et HSP90 (*Heat Shock Protein*) (Johnstone, Adam et al. 1987, Thery, Regnault et al. 1999, van Niel, Raposo et al. 2001), sont retrouvées de manière commune dans les VE, et cela quelle que soit la cellule d'origine (Figure 3). Ces protéines peuvent être utilisées comme marqueurs de VE (Thery, Boussac et al. 2001, Tauro, Greening et al. 2012). Les protéines sont réparties dans les différentes populations de VE, mais certaines protéines sont enrichies dans une sous-population par rapport à une autre (Palmisano, Jensen et al. 2012, Kowal, Arras et al. 2016). Par exemple, les exosomes ayant pour origine les compartiments endosomaux sont enrichis en protéines endosomales, comme les Rab, GTPase, SNAREs (*Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein Receptor*), dont certaines sont impliquées dans la biogénèse de corps multivésiculaires (Alix et Tsg101) (van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006). Dans les exosomes, sont retrouvées des protéines intervenant dans la transduction du signal, comme les protéines kinases la famille des protéines « 14-3-3 » et la protéine hétérotrimérique G (Thery, Boussac et al. 2001). Toutefois dans les différentes populations de VE, sont retrouvées les protéines du CMH-I et -II (Raposo, Nijman et al. 1996, Zitvogel, Regnault et al. 1998, Kleijmeer, Escola et al. 2001, Blanchard, Lankar et al. 2002). Les VE arborent aussi des protéines glycosylées ayant un rôle important dans le ciblage cellulaire des VE et de leurs interactions (Liang, Eng et al. 2014, Menck, Scharf et al. 2015). En effet, le profil

protéique des VE a révélé la présence de plusieurs protéines de liaison aux glycanes qui déterminent quelles cellules seront ciblées par les VE et comment (Looze, Yui et al. 2009, Yáñez-Mó, Siljander et al. 2015). Par exemple, la sélectine P de type C (CD62) présente à la surface des VE dérivées de plaquettes activées, permet à ces VE de cibler les cellules par le ligand classique de CD62, PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*) (Heijnen, Schiel et al. 1999). Les VE dérivées de lymphocytes B présentent un enrichissement en acide sialique α 2,3-lié permettant aux macrophages de les capturer *via* une interaction avec la sialoadhésine (appelées « CD169 » ou « Siglec1 ») (Saunderson, Dunn et al. 2014). La composition protéique des VE influence leurs rôles, leurs capacités d'adhésion et leurs ciblage cellulaires.

Les VE sont également enrichies en protéines qui s'associent avec des radeaux lipidiques, y compris les protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) et la flotilline (Thery, Regnault et al. 1999, Wubbolts, Leckie et al. 2003). L'association des lipides et des protéines est différente en fonction de la biogénèse, de l'origine et de l'activation cellulaire.

1.2.2.2 Lipidique

La membrane des VE est constituée d'une bicouche lipidique similaire à la membrane plasmique des cellules (exceptés les exosomes ayant pour origine les compartiments endosomaux) (Figure 3), mais diffère des simples couches de haute et basse densité des lipoprotéines (HDL et LDL) présentes dans les fluides biologiques (Laulagnier, Motta et al. 2004). La comparaison d'une banque de globules rouges et des MVs dérivées de ces cellules montrent la grande similarité de leurs compositions lipidiques à l'exception de la glycérophosphosérine polyinsaturée (38:4) qui est enrichie dans les MVs (Bicalho, Holovati et al. 2013). Les exosomes de plusieurs types cellulaires sont fortement enrichis en cholestérol et sphingomyéline au détriment de la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine ainsi qu'en acide gras pour la plupart saturés ou mono-insaturés (Wubbolts, Leckie et al. 2003, Laulagnier, Motta et al. 2004, Subra, Laulagnier et al. 2007, Bellingham, Coleman et al. 2012, Brouwers, Aalberts et al. 2013). Ces différences s'expliquent par une biogénèse distincte entre les exosomes et les MVs (Bicalho, Holovati et al. 2013). Les membranes des exosomes présentent une plus grande rigidité que les

membranes plasmiques des cellules (Laulagnier, Motta et al. 2004, Parolini, Federici et al. 2009). Cette rigidité serait un mécanisme dépendant du pH. Par exemple, les membranes des VE dérivées de basophiles (RBL-2H3), et traitées avec une solution acide sont devenues moins rigides et plus proches de la rigidité des membranes plasmiques cellulaires, qui sont restées inchangées dans le pH acide (Laulagnier, Motta et al. 2004). Cette observation est cohérente avec celle où un pH inférieur dans le microenvironnement tumoral augmente l'absorption cellulaire des VE (Parolini, Federici et al. 2009). L'augmentation de l'acidité rend les membranes des VE plus fluides favorisant ainsi leur fusion avec les membranes plasmiques cellulaires (Laulagnier, Motta et al. 2004). Ce concept nécessite d'être approfondi, parce que les cellules de mélanomes cultivées dans un milieu acide, libèrent des VE avec des membranes plus rigides (Parolini, Federici et al. 2009). Enfin, la plus grande rigidité des membranes des VE vient de leur haute teneur en sphingomyéline, lipides désaturés, et cholestérol qui peuvent contribuer à leur résistance à la dégradation, et donc à leur stabilité en tant que porteurs de différentes biomolécules (Huang, Yuan et al. 2013, Ridder, Keller et al. 2014). La comparaison avec la lignée d'origine des cellules cancéreuses parentales, a montré un enrichissement des VE en céramide et en acide phosphatidique, qui ont la capacité d'influencer le statut de la cellule receveuse (Llorente, Skotland et al. 2013). Par ailleurs, la teneur élevée en cholestérol et sphingomyéline des VE peut contribuer à l'apoptose des cellules réceptrices. En effet, des nanoparticules artificielles imitant la composition lipidique des VE réduisent la survie des cellules de tumeur pancréatique (Beloribi et al. 2012). L'ensemble de ces données montre que les lipides et les enzymes du métabolisme lipidique transférés par les VE peuvent participer à la modification du statut des cellules réceptrices.

1.2.2.3 Génomique

1.2.2.3.1 Contenu en ARN

Une avancée majeure dans la caractérisation des VE a montré qu'elles peuvent transférer des micro ARN et des ARN messagers (ARNm) pouvant affecter la synthèse protéique dans les cellules cibles des VE (Ratajczak, Wysoczynski et al. 2006, Valadi, Ekström et al. 2007). Par la suite, des études ont révélé le contenu en matériel génétique de VE en utilisant

des approches de séquençage à haut débit, à partir de cultures cellulaires cancéreuses de glioblastomes (Skog, Würdinger et al. 2008), et de fluides biologiques (Hunter, Ismail et al. 2008, Rabinowits, Gercel-Taylor et al. 2009, Michael, Bajracharya et al. 2010). Ces études ont révélé que les VE peuvent transporter une grande variété d'autres petits ARN non codants (Figure 3). On y retrouve des ARN transcrits chevauchés avec la région codée de la protéine, des séquences répétées, des ARN structurels et une grande variété de petits ARN interférents (des fragments d'ARN de transfert (ARNt) par exemple) (Bellingham, Coleman et al. 2012, Nolte-'t Hoen, Buermans et al. 2012). Toutefois, la teneur en ARN des VE varie en fonction du type cellulaire. Ainsi, des VE dérivées de cellules cancéreuses contiennent plus d'ARN que des VE dérivées de fibroblastes (Balaj, Lessard et al. 2011). Les ARNm enrichis dans les VE, sont le reflet du contenu en ARNm de la cellule d'origine suggérant que les molécules d'ARN sont sélectivement incorporées dans les VE (Ratajczak, Wysoczynski et al. 2006, Valadi, Ekström et al. 2007, Skog, Würdinger et al. 2008, Bellingham, Coleman et al. 2012, Nolte-'t Hoen, Buermans et al. 2012). L'analyse du contenu de VE dérivées de mastocytes et cellules cancéreuses a révélé que quelques ARNm et micro ARN sont systématiquement enrichis dans les VE (Valadi, Ekström et al. 2007, Skog, Würdinger et al. 2008).

1.2.2.3.2 Contenu en ADN

En plus de transporter de l'ARN, les VE sont, également, capables de véhiculer de l'ADN (Guescini, Genedani et al. 2010, Balaj, Lessard et al. 2011, Kahlert, Melo et al. 2014, Thakur, Zhang et al. 2014). Des VE soumises à un clivage enzymatique par un prétraitement avec de la DNase, présentent une diminution de la taille de l'ADN double brin de plus de 2.5 Kb par rapport à des VE intactes. Cela suggère que les fragments d'ADN double brin présents dans le culot de VE ne seraient pas enfermés dans la membrane des VE qui les auraient protégées contre l'activité de DNase (Thakur, Zhang et al. 2014). Certains cas ont montré que le contenu en ADN vésiculaire reflétait le contenu en ADN de la cellule parentale. En effet, des mutations de cellules cancéreuses retrouvées dans le gène *BRAF* ont été détectées dans l'ADN vésiculaire dérivé de cellules d'un mélanome mais aussi de cellules de cancer du pancréas (Kahlert, Melo et al. 2014, Thakur, Zhang et al.

2014). Cependant le rôle fonctionnel de l'ADN retrouvé avec les VE n'est pas entièrement élucidé (Svennerholm, Rodsand et al. 2016). Toutefois, les résultats suggèrent que le contenu génétique des VE peut influencer la fonction des cellules receveuses *in vitro* et *in vivo* (Cai, Wu et al. 2014). Récemment une équipe a montré à partir de VE dérivées de cellules stromales, le transfert d'ADN à des cellules receveuses (Fischer, Cornils et al. 2016). Ce transfert de matériel génétique ajoute à la complexité des mécanismes de communication des VE et de leur potentiel de transformation épigénétique.

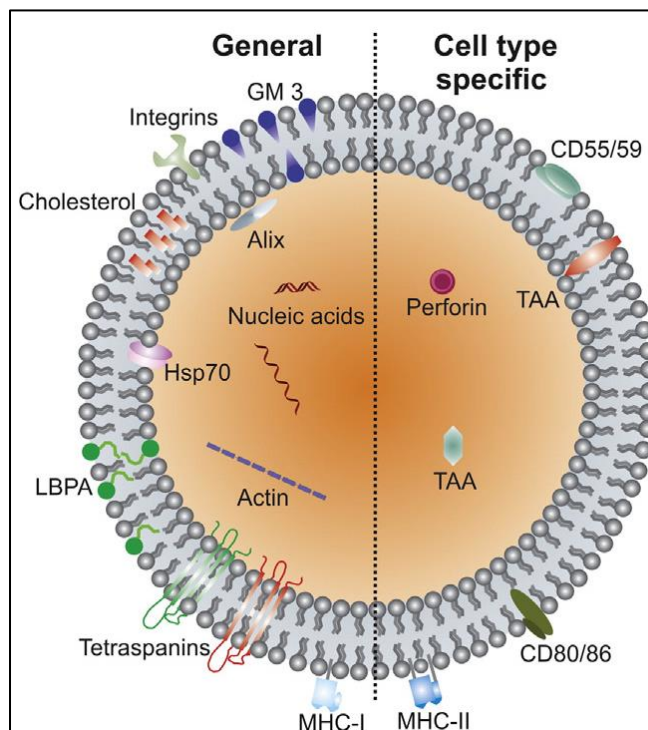


Figure 3. Composition d'une vésicule extracellulaire.

Représentation de la composition des VE avec quelques molécules clés communes ou spécifique d'un type cellulaire. Adapté de (Stremersch, De Smedt et al. 2016).

1.2.3 Fonction des VE

Les VE sont décrites comme ayant un rôle de communication intercellulaire (Bobrie and Théry 2013, Yanez-Mo, Siljander et al. 2015). Les protéines associées aux VE, incluant les récepteurs, les facteurs de transcription et les enzymes, peuvent être fonctionnelles et favoriser des changements phénotypiques dans les cellules receveuses (Aga, Bentz et al. 2014). Ce type de transfert pourrait contribuer à la propagation du phénotype agressif des

sous-populations de cellules malignes cancéreuses avec des tumeurs hétérogènes. D'ailleurs *via* des cellules de glioblastomes a été montré la libération dans les VE de la forme mutante du facteur de croissance épidermique (EGFRvIII) (Al-Nedawi, Meehan et al. 2008). Le transfert de ce récepteur aux autres cellules du gliome active la cascade de signalisation des MAPK/Akt (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) résultant en une augmentation de leur prolifération. Dans un autre exemple, comme le cancer du nasopharynx, la protéine latente membranaire du EBV (LMP1) régule à la hausse le facteur HIF- α (*1-alpha hypoxia inducible*) dans les exosomes (Aga, Bentz et al. 2014). De plus, HIF-1 α détecté dans les corps multivésiculaires des cellules de donneurs (cellules épithéliales humaines immortalisées, NP69), participe à la biogénèse des exosomes .L'addition des exosomes dans des cellules receveuses (HEK 293 T) a révélé une augmentation de l'activité de transcription en réponse à la protéine HIF-1 α sauvage, mais pas dans les exosomes contenant la protéine mutante (Aga, Bentz et al. 2014). Dans la continuité de cette étude, il a été montré que la protéine HIF-1 α dans les exosomes est capable de se coupler avec les séquences d'ADN, des éléments de réponse transcriptionnelle de l'hypoxie (Aga, Bentz et al. 2014). Entre autres, le traitement avec la protéine HIF-1 α diminue les niveaux d'E-cadhérine et déclenche la hausse de la régulation de la N-cadhérine dans les cellules cancéreuses nasopharyngiennes, avec l'effet opposé pour la forme mutante de HIF-1 α (Aga, Bentz et al. 2014). Les protéines libérées avec les VE peuvent aussi altérer le milieu extracellulaire. Les VE dérivées des cellules tumorales contiennent des métalloprotéinases de matrice (MMPs) qui peuvent digérer la matrice extracellulaire (Di Vizio, Morello et al. 2012, Shimoda and Khokha 2013), ce qui augmente l'invasion des cellules cancéreuses. ADAM10, une MMP transférée par les VE dérivées de fibroblastes cancéreux, favorise aussi la mobilité des cellules cancéreuses du sein (Shimoda, Principe et al. 2014). Les protéines véhiculées par les VE peuvent convoier des messages de signalisation dans les cellules receveuses de l'environnement proche et distant. Ce qui leurs confèrent ainsi de nombreuses fonctions comme l'invasion tumorales tel que mentionné si dessus, mais aussi dans la régulation de la réponse immunitaire et les infections virales.

1.2.3.1 Régulation du système immunitaire

Les VE participent de manière pléiotropique dans la régulation du système immunitaire. Les VE dérivées de lymphocytes T notamment, peuvent jouer différents rôles dans la régulation du système immunitaire, en induisant différents effets entre l'activation et la suppression du système immunitaire (Nolte-t Hoen and Wauben 2012). Au cours d'une réaction inflammatoire, la formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse) peut être régulée par les VE car ces dernières modulent la sécrétion de l'IL-8 et la migration des cellules endothéliales (Taverna, Flugy et al. 2012). Les VE participent aussi à la potentialisation de la réponse à l'IL-2, puisque le traitement des lymphocytes T CD4 avec des exosomes et de l'IL-2 augmente la sécrétion de MIF (*macrophage Migration Inhibitory Factor*), de l'IL-16 et du GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) en comparaison avec un traitement à l'IL-2 seul (Wahlgren, Karlson et al. 2012). Il a été également mis en évidence que les VE peuvent activer la production de cytokines lors d'une réponse contre un pathogène. Par exemple dans une réponse anti-virale, les VE peuvent contenir de l'UTPase issue de l'EBV qui est reconnue par le système immunitaire et induit la sécrétion de cytokines comme l'IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-12p70, IL-10 (Ariza, Rivallier et al. 2013). Dans une réponse antifongique, les VE issues des CPA (cellules présentatrices d'antigènes), comme les cellules dendritiques, infectées par le *Malassezia sympodialis* (une levure commensale de la peau) activent la production de TNF α et d'IL-4, par la capacité des VE à contenir des antigènes de *M.symphodialis* (Gehrmann, Qazi et al. 2011). Les VE participent à la réaction inflammatoire en modulant la réponse immunitaire et la production de cytokines pro-inflammatoires, mais sont aussi impliquées dans la résorption de cette dernière.

En effet, les VE dérivées de lymphocytes T ont des capacités immuno-suppressives, elles arborent les protéines activatrices de l'apoptose tel que FasL (Fas ligand) (Alonso, Mazzeo et al. 2011) et NKG2D (*Natural Killer Group 2D*), ce qui, entre autre, inhibe la cytotoxicité des cellules NK (*Natural Killer*) (Hedlund, Nagaeva et al. 2011), bloque la stimulation des lymphocytes T (Busch, Quast et al. 2008) et induit leur apoptose (Monleón, Martinez-Lorenzo et al. 2001), tout en régulant à la baisse la capacité de présentation d'antigènes des lymphocytes T aux cellules (Xie, Zhang et al. 2010). Les VE participent aussi à l'atténuation des réponses immunitaires. Par ailleurs, chez le rat, les VE dérivées de lymphocytes T régulateurs peuvent dans un modèle de transplantation rénale prolonger la

survie de l'allogreffe par l'expression de CD73 qui leur confère un rôle immunosuppresseur (Yu, Huang et al. 2013). Les VE peuvent également participer à l'immunosuppression et à la pathogenèse du cancer. En effet, les exosomes issus des cellules tumorales du sein peuvent inhiber la sécrétion de CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1*) et de l'IL-8 empêchant ainsi le recrutement et la polarisation des macrophages en TAM (*Tumor Associated Macrophage*) qui régulent négativement le système immunitaire, ce qui favorise le développement tumoral (Jang, Lee et al. 2013). Une autre étude a montré que les exosomes issus des cellules tumorales sont capables d'inhiber la maturation des cellules dendritiques et d'activer la production de TGF β (*Transforming Growth Factor*) dans la lymphe chez les souris (Yang, Kim et al. 2011). Les lymphocytes T régulateurs peuvent libérer plus d'exosomes en comparaison avec les autres lymphocytes T observés par une analyse quantitative par ELISA de CD63, un des marqueurs d'exosomes (Okoye, Coomes et al. 2014). De plus, ces mêmes exosomes sont capables de réguler négativement la prolifération des cellules T polarisées en Th1 et la sécrétion d'IFN γ (Interférons γ) (Okoye, Coomes et al. 2014).

1.2.3.2 Présentation antigénique

Les exosomes dérivés des cellules dendritiques et des lymphocytes B peuvent contenir des molécules du CMH-II, leur permettant de jouer un rôle dans la présentation antigénique (Thery, Regnault et al. 1999, Muntasell, Berger et al. 2007) (Figure 4). Par ailleurs, ces mêmes exosomes favorisent la prolifération des lymphocytes T CD4 ainsi que l'activation des lymphocytes B (Muntasell, Berger et al. 2007). La première présentation antigénique liée aux VE a été mise en évidence dans une lignée de cellules B infectées par EBV (Raposo, Nijman et al. 1996). Les exosomes dérivés de ces cellules arborent des molécules du CMH-II liées à des peptides antigéniques, considérées comme des molécules essentielles à la réponse immunitaire adaptative. Ces exosomes ont la capacité de présenter le complexe CMH-peptide à des lymphocytes T spécifiques, relevant ainsi leur potentiel rôle dans la réponse immunitaire adaptative. Différentes études ont montré que les complexes CMH-peptide présents sur les exosomes peuvent directement se fixer au TCR (« T-cell receptor ») et activer des lymphocytes T CD4 et lymphocytes T CD8 (Raposo, Nijman et al. 1996,

Admyre, Johansson et al. 2006, Nolte-'t Hoen, Buschow et al. 2009) mais aussi des lymphocytes T CD4 mémoires (Muntasell, Berger et al. 2007). Toutefois, cette activation des lymphocytes T par les exosomes, transportant les complexes CMH-peptide, dépend de l'état physiologique des cellules sécrétant les exosomes. Les exosomes dérivés de cellules dendritiques matures sont plus efficaces pour activer des lymphocytes *in vitro* en comparaison avec ceux des cellules dendritiques immatures (Segura, Nicco et al. 2005, Admyre, Johansson et al. 2006, Montecalvo, Shufesky et al. 2008), tandis qu'*in vivo* ils induisent l'activation des lymphocytes T effecteurs (Segura, Nicco et al. 2005). Les résultats de ces études ont révélé que la sécrétion d'exosomes, transportant des complexes CMH-I-peptide fonctionnels, est capable d'induire une réponse immunitaire humorale (anticorps) (Qazi, Gehrmann et al. 2009) et anti-tumorale dépendante des lymphocytes T CD8+ chez des souris (BALB/c (H-2d) et DBA/2j (H-2d)) inoculées avec des cellules cancéreuses (P815 (H-2d) « mastocytome » en synergie avec les BALB ; TS/A (H-2d) « adenocarcinome » en synergie avec DBA) (Zitvogel, Regnault et al. 1998). Les exosomes dérivés de cellules dendritiques immatures sont eux aussi capables d'induire une réponse anti-tumorale effectrice si ceux-ci sont co-injectés avec un adjuvant (Chaput, Scharz et al. 2004). Les exosomes peuvent aussi activer les lymphocytes T naïfs. Pour cela, les exosomes doivent être capturés par les cellules dendritiques, qui peuvent présenter le complexe CMH-peptide exosomal aux lymphocytes T spécifiques par présentation croisée (Thery, Duban et al. 2002, Muntasell, Berger et al. 2007). Les différences de procédés d'activation des lymphocytes T CD4 par les exosomes viendraient probablement de la conformation active de l'intégrine et de l'antigène associé à la fonction lymphocytaire LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) à la surface des lymphocytes matures en comparaison des immatures. Cela permet une meilleure efficacité de fixation des protéines d'adhésion ICAM1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), présentes sur les exosomes, aux lymphocytes T (Nolte-'t Hoen, Buschow et al. 2009) tout comme l'expression de LFA-1 sur les cellules dendritiques (Segura, Guérin et al. 2007).

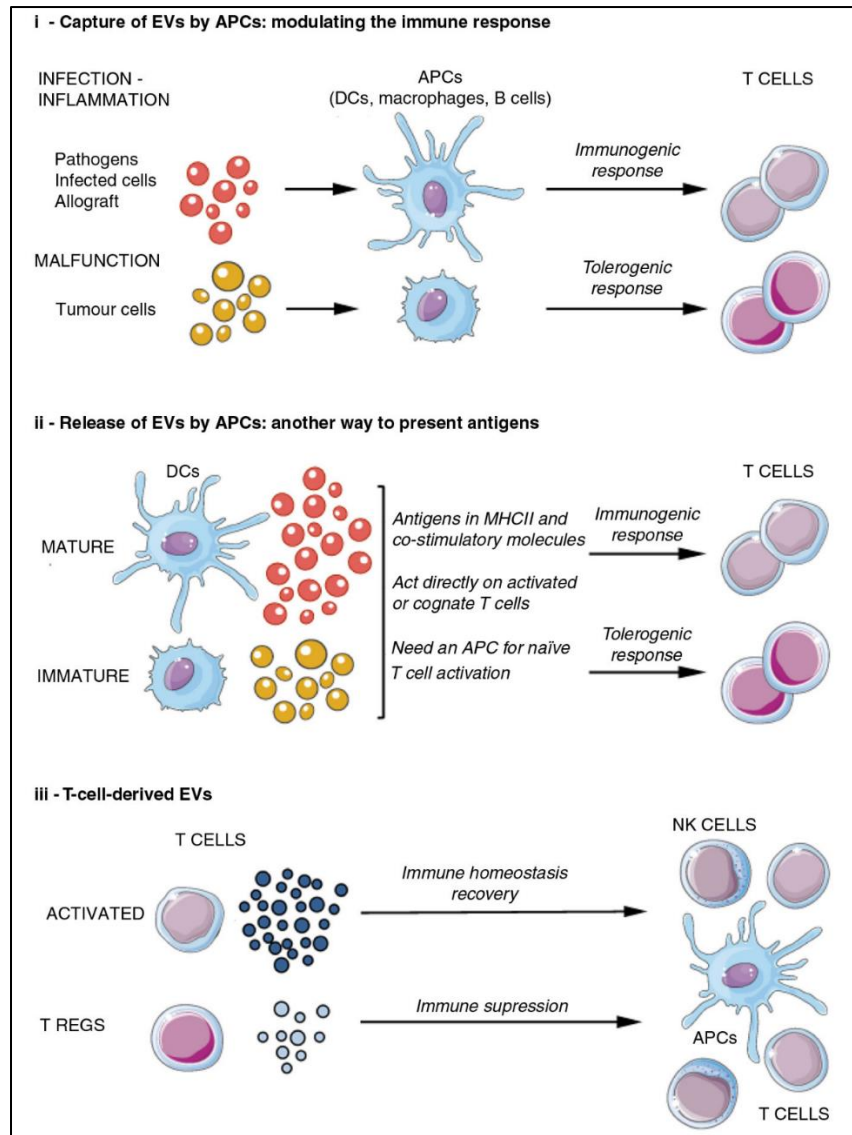


Figure 4. Les vésicules extracellulaires et la régulation du système immunitaire.

Les VE interviennent dans la régulation de la réponse immunitaire de plusieurs manières : i) la capture des VE par les CPA va induire une réponse immunogénique chez les lymphocytes T, tandis que les VE de tumeurs vont avoir un effet tolérogénique pour favoriser leur survie. ii) Les VE relarguées par les CPA, quant à elles, jouent un rôle dans la présentation antigénique. En fonction des CPA dont elles dérivent, elles induiront une réponse immunogénique ou tolérogénique. iii) Les lymphocytes T activés vont relarguer des VE capables d'activer le système immunitaire, tandis que les lymphocytes T régulateurs vont relarguer des VE ayant un impact immunosuppresseur ainsi les VE contribuent à l'homéostasie de la réponse immunitaire. Tiré de (Yáñez-Mó, Siljander et al. 2015)

Les capacités de régulation du système immunitaire et de présentation antigénique des VE sont exploitées comme usages thérapeutiques (Johnsen, Gudbergsson et al. 2014, Lener, Gimona et al. 2015, Thind and Wilson 2016).

1.2.4 Usages thérapeutiques des VE

L'usage thérapeutique des VE a déjà été exploité puisqu'entre 1999 et 2002 des études de phase I avec des VE comme nouveau type de thérapie anti-cancer ont été réalisées chez l'humain. Dans ces études les VE purifiées des cellules dendritiques des patients étaient injectées pour susciter une réponse immunitaire contre des tumeurs (des poumons, des intestins et de la peau) montrant ainsi la faisabilité de l'approche (Escudier, Dorval et al. 2005, Morse, Garst et al. 2005, Dai, Wei et al. 2008). Plus récemment une étude de phase-II réalisée chez des patients atteints de cancer du poumon non opérables, (NSCLC ; *Non Small Cell Lung Cancer*) a confirmé la capacité des exosomes dérivés de cellules dendritiques du patients à stimuler la réponse anti-tumorale des cellules NK (Besse, Charrier et al. 2016). Les exosomes dérivés de cellules dendritiques ont montré que leur capacité à induire la réponse immunitaire des cellules T et des cellules NK est applicable en thérapie contre les cancers (Pitt, Charrier et al. 2014, Pitt, Andre et al. 2016). De plus, les exosomes dérivés de cellules dendritiques peuvent avoir un rôle immunosuppresseur qui pourrait intervenir comme thérapie pour des maladies auto-immunes (comme les arthrites). En effet, les exosomes dérivés de cellules dendritiques immatures (Peché, Heslan et al. 2003), ou de cellules dendritiques soumis à un traitement immunosuppresseur ou encore modifiées (par un vecteur viral exprimant le gène codant pour l'IL-10) pour que les VE expriment des cytokines immunosuppressives (Kim, Lechman et al. 2005, Bianco, Kim et al. 2009), peuvent réduire/supprimer l'inflammation dans un modèle d'arthrite induite au collagène chez des souris femelle C57BL/6 (H-2Kb) et mâle DBA1/LacJ (H-2Kq). Ces capacités immuno-régulatrices des exosomes dérivés des cellules dendritiques sont des pistes thérapeutiques pouvant s'appliquer dans différents traitements de médecine personnalisée.

Récemment, une équipe a émis l'hypothèse d'utiliser les exosomes en parallèle d'une thérapie immunitaire avec des cellules dendritiques contre l'infection par le VIH-1

(Ellwanger, Crovella et al. 2016), suggérant leur possible utilisation thérapeutique dans cette pathologie.

1.2.5 VE et particules virales

Le VIH-1 tout comme les exosomes peut se retrouver dans les compartiments endosomaux des cellules et les exploiter pour sa dissémination et sa survie (échapper au système immunitaire) (Pelchen-Matthews, Raposo et al. 2004). Une équipe a mis en évidence la présence de particules virales dans les compartiments endosomaux (contenant les exosomes) de cellules dendritiques (Izquierdo-Useros, Naranjo-Gomez et al. 2009). Notre laboratoire a observé une accumulation d'exosomes dans le surnageant de culture de cellules dendritiques en contact avec le VIH-1 (Subra 2013, Mfunyi, Vaillancourt et al. 2015). Nous avons aussi relevé une augmentation de la libération de vésicules chez des lymphocytes infectés par le VIH-1 (Hubert, Barbeau et al. 2015). En fonction de leur origine cellulaire, les VE transfèrent des facteurs pro ou anti-viraux aux cellules influençant les réponses cellulaires de l'hôte (Khatua, Taylor et al. 2009, Li, Liu et al. 2013, Narayanan, Iordanskiy et al. 2013). Il a été observé que des VE dérivées de cellules mononucléaires périphériques du sang, ou de plaquettes transféraient les co-récepteurs du VIH-1 CCR5 (*C-C Chemokine Receptor type 5*) ou CXCR4 (*C-X-C Chemokine Receptor type 4*) aux cellules n'en possédant pas, favorisant ainsi l'entrée du virus dans ces cellules (Mack, Kleinschmidt et al. 2000, Rozmyslowicz, Majka et al. 2003, Cicala and Arthos 2014). La présence de la protéine ADAM-17 (*ADAM metallopeptidase domain 17*) associée aux VE interviendrait notamment dans l'activation de la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4 quiescents (Arenaccio, Chiozzini et al. 2014), et dans la réactivation des virus en latence (Arenaccio, Anticoli et al. 2015). Pendant la pathogénèse, les VE dérivées des cellules infectées vont influencer la survie des lymphocytes T CD4, que ce soit en les activant, ce qui favorise leurs infections par les virus (Lenassi, Cagney et al. 2010, Arenaccio, Chiozzini et al. 2014), ou en augmentant leur profil apoptotique (Lenassi, Cagney et al. 2010, Subra 2013). De plus, les VE sécrétées par des cellules infectées peuvent arborer et transférer des protéines virales, comme la protéine Nef (*Negative Regulatory Factor*) ce qui rend les cellules receveuses de ces VE Nef+ plus permissives à la réplication virale (Arenaccio, Chiozzini et al. 2014). Les VE dérivées de cellules

infectées peuvent également transférer des ARN viraux, comme l'ARN TAR intervenant dans la réplication virale (Narayanan, Iordanskiy et al. 2013). Les VE peuvent avoir un rôle d'inhibition de l'infection, c'est le cas pour des VE secrétées par les lymphocytes T CD8 pouvant inhiber la transcription du VIH-1 (Tumne, Prasad et al. 2009). Les VE peuvent rendre les cellules receveuses plus résistantes à l'infection par le VIH-1 via l'incorporation d'APOBEC3G (*Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3G*) (Khatua, Taylor et al. 2009).

Les VE jouent des rôles pro ou anti-viraux dans l'infection et leur caractérisation améliorerait notre compréhension de la pathogénèse. De plus les VE, par leur composition, leurs rôles et leur biodisponibilité dans les fluides, possèdent un potentiel de biomarqueur à exploiter (Tan, Rajadas et al. 2013, Natasha, Gundogan et al. 2014, Fais, O'Driscoll et al. 2016).

1.2.6 Usages de biomarqueur

L'utilisation d'un biomarqueur permet de renseigner sur l'état médical d'un patient, afin d'établir des diagnostics et des pronostics plus précis, afin d'évaluer l'efficacité et les traitements thérapeutiques compatibles. Les VE sont facilement accessibles car elles circulent dans les différents fluides biologiques du corps. Elles se retrouvent dans le plasma (Caby, Lankar et al. 2005, Kowal, Arras et al. 2016), les urines (Pisitkun, Shen et al. 2004), les fluides séminaux (Saez, Frenette et al. 2003, Sahlen, Nilsson et al. 2010), les semences (Poliakov, Spilman et al. 2009), les sécrétions nasales (Lasser, O'Neil et al. 2011), le lait maternel (Lasser, Alikhani et al. 2011), le fluide cérébrospinal (Street, Barran et al. 2012), péritonéal (Tokuhisa, Ichikawa et al. 2015), les lavages bronchoavéolaires (Admyre, Grunewald et al. 2003), la bile (Witek, Yang et al. 2009), le fluide amniotique (Keller, Rupp et al. 2007), le liquide synovial (Gyorgy, Szabo et al. 2012), la salive (Palanisamy, Sharma et al. 2010) et la lymphe (Hood 2016). En combinaison avec la biodisponibilité des VE, elles représentent une source stable de micro ARN et protéines marqueurs de progression de pathologie (Weber, Baxter et al. 2010, Thind and Wilson 2016). C'est leur composition (bicouche lipidique) qui permet aux VE de protéger leur contenu contre l'environnement extracellulaire (Huang, Yuan et al. 2013, Ridder, Keller et al. 2014) par

rapport aux protéines et à l'ARN libre dans le sang soumis aux dégradations enzymatiques et plus difficilement détectables. Dans plusieurs échantillons, il a été détecté une concentration augmentée en VE dans le sérum de patients avec tumeur, par rapport à des individus sains. De plus, leur contenu était associé à une molécule qui possédait une valeur diagnostique/pronostique ou un potentiel d'évaluation de la progression dans différents cancers, comme celui des ovaires (Taylor and Gercel-Taylor 2008), des poumons (Rabinowits, Gercel-Taylor et al. 2009, Taverna, Giallombardo et al. 2016), du foie (Wang, Li et al. 2013) et des intestins (Rahbari, Rahbari et al. 2016). L'exploitation du contenu protéique et génomique des VE permet la découverte de nouveaux biomarqueurs. Par exemple, un panel de 8 protéines a été révélé; *Resistin*; GTP NRas; EPS8L1 et EPS8L2 (*Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1 et 2*); Mucin 4, *EH Domain-containing protein 4*; *Retinoic acid-induced protein 3*; *Alpha subunit of GsGTP binding protein*) associées aux VE augmentées dans l'urine de patients atteints de cancer de la vessie par rapport à des individus sains (Smalley, Sheman et al. 2008). Le séquençage en micro ARN des VE issues du plasma, a identifié 4 micro ARN (miR-378a, miR-379, miR-139-5p, and miR-200b-5p) spécifiques de tumeurs pouvant éventuellement être utilisés en test de détection/dépistage du cancer du poumon (Cazzoli, Buttitta et al. 2013). Les VE sont également impliquées dans des dérèglements neurologiques, métaboliques, cardiovasculaires, rénaux, et sont donc des candidats potentiels de biomarqueurs de ces maladies (Colombo, Borgiani et al. 2012, Müller 2012, Danielson and Das 2014).

Les VE sont aussi exploitées par les virus pour moduler leur infectivité et leur dissémination (Wurdinger, Gatson et al. 2012). Dans le cadre de la pathologie du VIH-1 leur caractérisation dans le plasma pourrait fournir des informations pertinentes pour évaluer l'activation immunitaire. En effet, la réplication virale se déroule principalement dans les tissus, notamment dans le tissu lymphoïde associé au tube digestif qui constitue le réservoir principal du virus (Kotler, Reka et al. 1991). Les VE libérées dans les tissus muqueux ou le tractus digestif à la suite de l'infection peuvent circuler dans le sang, et puisque les VE sont le reflet de l'état d'activation cellulaire leur analyse permettrait d'évaluer l'activation tissulaire (Rabinowits, Gercel-Taylor et al. 2009). La mesure de ces vésicules extracellulaires plasmatiques (VEsp) ainsi que l'évaluation de leur contenu pourraient nous renseigner sur la pathogénèse de l'infection par le VIH-1 (Figure 5.).

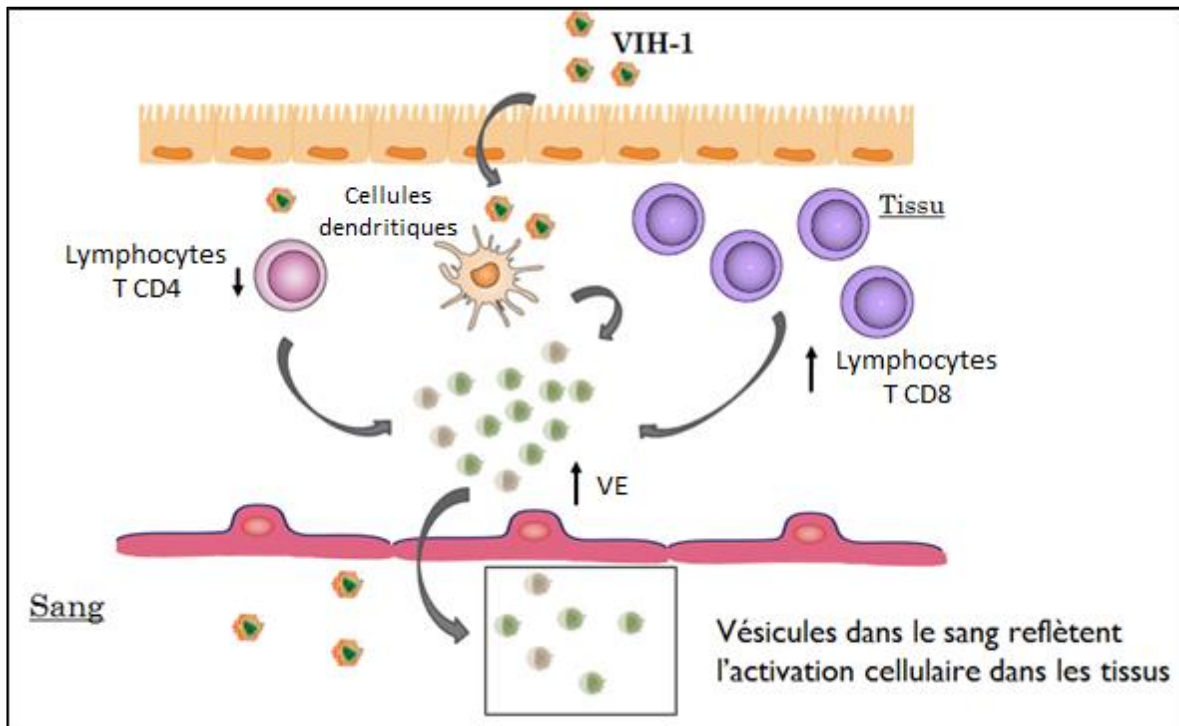


Figure 5. Schématisation du rôle de biomarqueur potentiel des VEsp dans l'infection par le VIH-1.

Au cours de l'infection par le VIH-1, les VE libérées dans les tissus peuvent se retrouver dans le sang. L'analyse de ces VEsp permettrait d'étudier le reflet de l'activation cellulaire au cours de la pathogénèse. Adapté de Audrey Hubert.

Une étude menée dans notre laboratoire a montré le potentiel de biomarqueur des VEsp dans la pathogénèse associée à l'infection par le VIH-1 (Hubert, Subra et al. 2015). Ces travaux ont caractérisé les VEsp de patients contrôles, infectés non traités (naïfs), traités et des élites contrôleurs, c'est à dire capables de contrôler l'infection avec leur propre système immunitaire. Chez les patients naïfs, la taille des VEsp est en moyenne plus grande et plus hétérogène que les VEsp des sujets contrôles, traités et élites. Cette population de VEsp est composée de différents types de vésicules comme les exosomes et les MVs. De plus, la taille et l'activité AChE des VEsp des patients infectés corrélaient négativement avec le ratio CD4/CD8, le nombre de lymphocytes T CD4 et positivement avec le nombre de lymphocytes T CD8 (Hubert, Subra et al. 2015). De plus, la détection des protéines Tsg-101 et de l'activité AChE suggère que les exosomes sont plus abondants chez les patients naïfs. Une autre étude a montré l'association de cytokines (IL-1 α ; IFN- α ; CXCL10) avec les VEsp augmentées chez les patients infectés par le VIH-1 (Konadu, Chu et al. 2015).

Toutefois la caractérisation des sous populations de VEsp, et de leur potentiel de biomarqueur est liée aux limites des méthodes de purification actuelles.

1.2.7 Méthodes de purifications et de caractérisation des VE

L'intérêt des VE a mené au développement de différentes méthodes d'isolation et de purification dans différents milieux de culture et fluides biologiques. Le défi majeur dans la caractérisation des vésicules est de standardiser les méthodes d'analyses des VE et leurs sous-populations (Thery, Amigorena et al. 2006, Kowal, Arras et al. 2016). De plus, en amont de cela, d'autres paramètres sont à prendre en compte dans les limites de standardisation de la purification des VE, comme la procédure de récolte du sang (le type d'anti-coagulants utilisés) (Gyorgy, Paloczi et al. 2014), le temps du processus et les conditions de stockage (Muller, Hong et al. 2014, Zonneveld, Brisson et al. 2014) qui peuvent influencer la quantité et la qualité des VE (Rubin, Crettaz et al. 2010). En aval, bien que plusieurs méthodes soient utilisées pour purifier les VE, celles-ci comportent toutes des avantages et des limites. Pour améliorer la pureté, il est fréquent d'utiliser plusieurs méthodes surtout dans des échantillons complexes contenant beaucoup de contaminants tel que le plasma). De fait, plusieurs kits commerciaux de purification de VE sont maintenant accessibles et sont souvent utilisés pour concentrer les VE d'un échantillon (exemple ; ExoEasy Maxi Kit, Qiagen ; ExoPure™ Immunobeads, ExoQuick™). Toutefois, l'utilisation de ces kits va enrichir a différent degré de pureté, les populations de VE avec des contaminants tels que des agrégats protéiques (Royo, Zuniga-Garcia et al. 2016).

1.2.7.1 Centrifugation différentielle

Les VE analysées à partir des fluides biologiques ou des cultures cellulaires sont le plus souvent précipitées par centrifugations différentielles consistant en des centrifugations/ultracentrifugations successives (Thery, Amigorena et al. 2006). Cette méthode repose sur la différence de taille et de densité entre les différents composants ainsi que les VE dans les différents milieux (Thery, Amigorena et al. 2006). Les préparations

peuvent être filtrées pour concentrer et purifier partiellement les VE dans les échantillons avant de les séparer (Thery, Amigorena et al. 2006). En premier les cellules, les plaquettes et les corps apoptotiques sont retirés avec une ou plusieurs étapes de centrifugation à faible vitesse (300 x g pour retirer les cellules, 3200 x g pour les plaquettes et corps apoptotiques) (Witwer, Buzas et al. 2013). Ensuite les grosses vésicules (MVs, ectosomes) sont précipitées avec une centrifugation entre 10 000 – 20 000 x g (Keerthikumar, Gangoda et al. 2015). Pour finir, les petites vésicules sont précipitées avec une ultracentrifugation entre 100 000 – 120 000 x g (Witwer, Buzas et al. 2013). Bien que cette technique soit prédominante, elle reste dépendante de la viscosité du milieu (Lamparski, Metha-Damani et al. 2002, Momen-Heravi, Balaj et al. 2012). Il ne faut pas oublier que, potentiellement, il reste des contaminants (exemple ; particules de lipoprotéines, protéines (ARN), des agrégats, etc..) mais aussi des virus qui peuvent être purifiés pendant l’ultracentrifugation (Van Deun, Mestdagh et al. 2014, Zonneveld, Brisson et al. 2014). De plus, les VE peuvent faire des agrégats entre elles venant interférer avec la séparation par la taille des VE (Witwer, Buzas et al. 2013, Linares, Tan et al. 2015).

1.2.7.2 Précipitation et immunocapture

D’autres techniques permettent d’isoler les VE, comme la précipitation ou l’immunocapture. La précipitation des VE, *via* des polymères hydrophiles (polyéthylène glycol ; PEG) ou des fortes concentrations en sels est une méthode d’abord utilisée pour concentrer des particules virales dans les urines (Kimpton, Corbitt et al. 1990). Elle a été adaptée et est utilisée comme une étape de concentration du matériel de départ pour les VE (Kordelas, Rebmann et al. 2014). Le désavantage de cette technique réside particulièrement dans la contamination de protéines libres (agrégats) (Van Deun, Mestdagh et al. 2014) précipitées avec les polymères PEG qui interfèrent avec la fonctionnalité et l’analyse des VE (Lee, Carney et al. 2015).

Une technique de capture par affinité ou immunocapture représente un potentiel d’enrichissement de sous-populations. La capture par affinité repose, sur la reconnaissance des protéines à la surface des VE par des anticorps (exemple ; des anticorps couplés à des billes) (Kim, Yoo et al. 2012, Yoo, Kim et al. 2012). Cette méthode possède le meilleur

potentiel pour séparer les sous-populations de VE entre elles et son application est étroitement liée avec l'établissement des marqueurs spécifiques et exclusifs à ces populations (Aass, Ovstebo et al. 2011, Im, Shao et al. 2014, Grasso, Wyss et al. 2015, Kowal, Arras et al. 2016). Une alternative de cette approche serait d'utiliser d'autre agent pour précipiter les VE, tel que l'héparine qui a une affinité commune pour les VE (Balaj, Atai et al. 2015). Cependant, il faut faire attention aux protéines présentes dans les fluides capables de se lier à l'héparine pouvant contaminer les purifications de VE (Balaj, Atai et al. 2015).

1.2.7.3 Chromatographie (tamisage moléculaire)

Une autre technique reposant sur la séparation par la taille est la chromatographie par exclusion de taille (Boing, van der Pol et al. 2014). Cette méthode est appliquée dans les protocoles cliniques (Boing, van der Pol et al. 2014, Nordin, Lee et al. 2015) car son rendement important est obtenu par un traitement rapide et, elle permet avant tout la conservation de la fonctionnalité des VE (Muller, Hong et al. 2014, Hong, Funk et al. 2016). En termes de contamination, la dilution de l'échantillon et la co-précipitation des lipoprotéines (un faible pourcentage) sont reliées à la technique (Boing, van der Pol et al. 2014, Welton, Webber et al. 2015). Toutefois, en couplant des étapes de filtration séquentielle, les gros et petits contaminants peuvent être retirés mais cela vient ajouter un désavantage, car l'intégrité des VE peut être altérée par les forces de centrifugation ou par la pression (Witwer, Buzas et al. 2013), sans compter que l'adhésion des VE aux membranes peut moduler l'enrichissement (Lobb, Becker et al. 2015). Ceci dit, l'utilisation des filtrations sert généralement d'étapes préparatoires dans les différentes méthodes énoncées ci-dessus (Lobb, Becker et al. 2015).

1.2.7.4 Gradient de densité

Une autre méthode commune est l'utilisation d'un gradient de densité (à l'iodixanol ou au sucrose) ce qui améliore la pureté des VE isolées (Maiolo, Paolini et al. 2015). Par exemple, la séparation de VE par centrifugation sur un gradient de sucrose, permet de réduire la présence de la glycoprotéine 1b α dans les exosomes comparé aux MVs (Heijnen, Schiel et al. 1999). Toutefois, cette technique représente un désavantage en terme de temps pour un critère d'application clinique (Welton, Webber et al. 2015). De plus, l'effet du sucrose sur la fonctionnalité des VE n'est pas encore déterminé lors de ce processus (Lötvall, Hill et al. 2014). Dans le cadre du VIH-1, une séparation physique par la taille et par la densité entre des particules virales et des exosomes est difficile (Nguyen, Booth et al. 2003, Gould, Hildreth et al. 2004, Kramer, Pelchen-Matthews et al. 2005). Les particules virales peuvent-être co-précipitées avec des VE rajoutant un biais dans la purification.

1.2.7.5 Gradient de vitesse

Pour purifier les VE issues du plasma d'un patient infecté par le VIH-1, il faut parvenir à séparer les particules virales, des VE. En effet, une des sous-populations, qu'est les exosomes, possède une densité de 1.13 à 1.21 g/l (Thery, Boussac et al. 2001) pour une taille comprise entre 30 et 100 nm similaire à celles des particules virales de taille de 100 nm et de densité 1.16 à 1.18 g/l (Wang, Horton et al. 1999). Le principe de la séparation des particules par la vitesse repose sur la différence de vitesse de déplacement des particules dans les fractions du gradient et non sur la densité des particules. Ainsi l'utilisation d'un gradient de vitesse à l'iodixanol a fait ses preuves dans la séparation des particules virales et des VE (Dettenhofer and Yu 1999, Cantin, Diou et al. 2008, Aass, Ovstebo et al. 2011, Konadu, Huang et al. 2016), permettant d'améliorer l'enrichissement des productions virales ou des sous-populations de VE.

Chapitre 2 Problématique, hypothèse de recherche et objectifs

2.1 Problématique

Le ratio lymphocytes T CD4/CD8 est encore aujourd'hui le biomarqueur de l'infection par le VIH-1 ((Sainz, Serrano-Villar et al. 2013, Serrano-Villar and Deeks 2015). Toutefois, ce ratio ne reflète pas l'évolution de la pathogénèse dans les tissus comme le pourrait les VEsp. En effet, les VEsp peuvent nous renseigner sur l'impact de la pathogénèse et les différentes populations cellulaires affectées, ainsi que l'efficacité des traitements aux ART sur les patients. Cependant les différentes méthodes utilisées pour purifier et caractériser les VE présentent des limites (Kowal, Arras et al. 2016). Ainsi la purification ou l'élimination des MVs serait un premier pas vers une amélioration des méthodes de purification et de caractérisation des VE. Dans l'infection par le VIH-1 la caractérisation des VE issues du plasma permettrait d'étudier leur potentiel de biomarqueurs et de valider notre première étude sur les VEsp (Hubert, Subra et al. 2015). Dans cette étude les VEsp AChE+ provenant des patients naïfs ou traités étaient plus abondantes et les marqueurs de la population d'exosomes enrichis. C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de maîtrise, et plus précisément la caractérisation de sous-types de VEsp présentes dans le plasma des patients VIH-1.

2.2 Hypothèse

Nous émettons l'hypothèse que les VEsp AChE+ détectées chez les patients infectés représentent une population d'exosomes qui serait un marqueur plus précis de l'évolution de la pathogénèse de l'infection par le VIH-1. Trois objectifs ont été définis pour répondre à notre hypothèse.

2.3 Objectifs

- Optimiser la purification des VEsp AChE+ à partir de plasma de patients infectés par le VIH-1.
- Valider le potentiel de biomarqueur des VEsp AChE+.

-Caractériser la population des VEsp AChE+ grâce au gradient de vitesse.

Chapitre 3 Matériels et Méthodes

3.1 Cohorte

Les prélèvements sanguins proviennent des patients de la clinique de la Dre Sylvie Trottier et de l'unité hospitalière de recherche, d'enseignement et de soins sur le sida (UHRESS). Les échantillons sanguins ont été prélevés dans un tube contenant soit du citrate de sodium ou de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) comme anticoagulant. Les plasmas ont été récupérés suite à une centrifugation à 400 x g des tubes de sang, puis déplaquetés via une centrifugation de 3200 x g pendant 15 minutes et conservés à -80 °C. Cette cohorte se composait de 8 sujets contrôles non infectés, de 18 sujets infectés par le VIH-1 dont 12 sous traitement avec ART (traités), et 6 sans aucun traitement appelés naïfs. Les patients traités possédaient une charge virale indétectable (<40 copies/ μ L) et étaient infectés depuis 3 ans jusqu'à 29 ans au moment du prélèvement. Les patients naïfs n'ayant jamais reçu de traitement aux ART possédaient des charges virales détectables entre 60 copies/mL et 266 413 copies/mL et une durée d'infection allant de moins d'un an à 10 ans au moment du prélèvement. Tous les participants de cette étude ont donné un consentement libre et éclairé. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU de Québec.

3.2 Réactifs et anticorps

3.2.1 Réactifs

Le PBS (tampon phosphate salin) a été acheté chez Wisent™ (Montréal, Québec, Canada) et a toujours été utilisé filtré à 0.22 μ m et stérile. Le polymère ExoQuick™ a été acheté chez System Biosciences (Mountain View, Californie, États-Unis). Le FBS (*Fetal Bovine Serum*) chez Sigma (cat : F1051, lot : 12H046), les réactifs acétylthiocholine chlorure, le 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acide) et l'Optiprep™ (Iodixanol) ont été achetés chez Sigma-Aldrich™ (St Louis, Missouri, États-Unis). Le kit de dosage de protéines : BCA *Protein Assay Kit* (cat : 23227) chez Thermo Scientific (Rockford, États-Unis). Le luminata forte a été acheté chez Fischer Scientific™ (Waltham, Massachusetts, États-Unis). L'*enhancer* a été acheté chez Calbiochem de EDM chemicals, inc (Darmstadt, Allemagne) et la paraformaldéhyde chez Alpha Aesar Avocado Lancaster (Ward Hill, Massachusetts, États-Unis).

3.2.2 Anticorps

L'anti-Tsg101 (4A10) a été acheté chez Cerdalane (Cambridge, Massachusetts, États-Unis), l'anti-CMH-1 (sc-55582), l'anti-Alix (sc-53538), l'anti-Hsp70 (sc-24) et l'anti-LAMP-2 (sc-18822) ont été achetés chez Biotechnology (Santa Cruz, Californie, États-Unis).

3.3 Méthodes

3.3.1 Purification des VEsp

Les VEsp ont été précipitées à partir de 250 μ L plasma déplaqueté provenant des patients de la cohorte décrite précédemment. Deux culots distincts de VEsp ont été obtenus (le culot MVs et le culot Exo), le culot MVs grâce à une centrifugation de 17 000 x *g* pendant 30 minutes et le culot Exo par une précipitation de ce surnageant avec le kit ExoQuick™. En suivant les recommandations du commerçant nous avons obtenu 63 μ L d'ExoQuick™ pour 250 μ L d'échantillon utilisé avant de procéder à une incubation de 30 minutes à température pièce. Selon le commerçant, il est ensuite recommandé de faire une centrifugation de 30 minutes à 1500 x *g* pour obtenir le culot Exo que nous avons lavé avec du PBS, en re-centrifugeant à 1500 x *g* pendant 5 minutes. Enfin les deux culots ont été resuspendus dans 250 μ L de PBS et conservés pour les différentes analyses décrites par la suite.

3.3.2 Mesure de l'activité acétylcholine estérase

Les échantillons (25 μ L) ont été déposés en duplicata dans une plaque 96 puits. Le substrat, l'acétylcholine, a été préparé à une concentration finale de 1,25 mM dans du PBS à un pH 8 alors que le réactif d'Elman le 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) a été préparé à une concentration finale de 0,1 mM dans du PBS à pH 7. L'hydrolyse de l'acétylcholine en acétyle et en choline par l'AChE est déterminé par la formation du précipité jaune le 2-nitro-5-thiobenzoate qui est absorbé à 450nm. (Ellman, Courtney et al. 1961). Ce test enzymatique nous a permis indirectement d'évaluer l'abondance de l'AChE, un marqueur potentiel d'exosomes (Johnstone, Adam et al. 1987, Konadu, Huang et al. 2016).

3.3.3 Préparation de la courbe standard

Une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'exosomes bovins (Exob) a été utilisée comme contrôle interne afin de pouvoir comparer chacune des expériences entre elles et de déterminer la limite de détection. La courbe standard a été réalisée à partir d'exosomes bovins (Exob) obtenus à partir du FBS. Le sérum (500mL) a été décongelé à 4°C, puis décomplémenté dans un bain-marie de 56°C pendant 30 minutes. Une fois décomplémenté le sérum a été refroidi rapidement sur glace. Ensuite, il a été réparti dans 12 tubes puis ultracentrifugé à 100 000 x g pendant 16 heures. Une fois l'ultracentrifugation terminée, le culot d'Exob a été resuspendu dans 150 µL PBS par tube soit 1.8 mL puis aliquoté en 10 µL et conservé à -80°C. Cette courbe standard représente l'activité AChE en fonction de la concentration protéique des Exob (Figure 6).

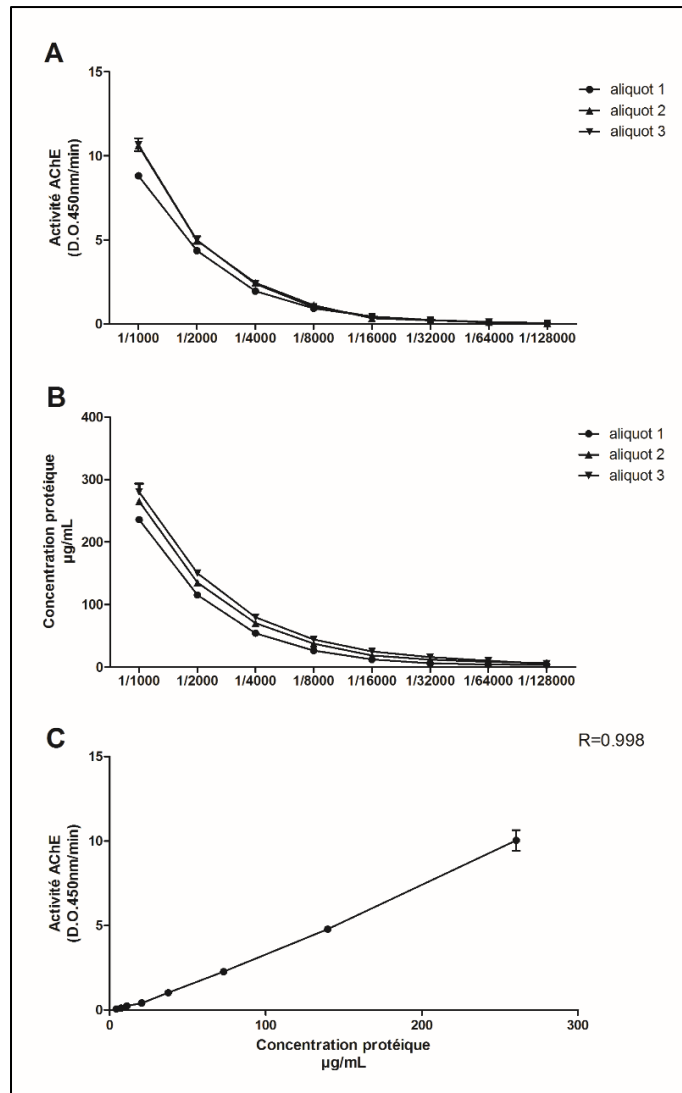


Figure 6. Caractérisation de la courbe standard d'exosomes bovins.

Trois aliquots d'Exob provenant du même lot ont été dilués en série. L'activité AChE a été mesurée (panel A) et la concentration protéique évaluée (panel B). La corrélation entre les activités AChE et les concentrations en protéines montre un coefficient de 0.998 en utilisant le test de Pearson.

La courbe standard a été diluée en partant de la première dilution 1/1000 jusqu'à 1/128 000. Chacun des 3 aliquots a été lu en duplicata et réalisé par trois expérimentateurs différents pour la mesure de l'activité AChE (Figure 6 panel A) et le dosage protéique (Figure 6 panel B). Nous pouvons voir que les mesures varient très peu entre les 3 expérimentateurs. Les 3 expériences ont ensuite été compilées ensemble en tenant compte des écart-types moyens entre les duplicatas de chaque expérience. La courbe standard (C) ainsi obtenue possède un coefficient de corrélation R de Pearson de 0.998 qui indique une forte corrélation positive

tel qu'attendu. Cette courbe détermine aussi la limite de détection de nos tests et a toujours été utilisée comme standard interne pour nos essais. La grande reproductibilité de cette courbe nous a aidé à valider chacune de nos mesures.

3.3.4 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé avec le test BCA (*BiCinchoninic Acid assay*). C'est un dosage colorimétrique des protéines basé sur l'acide bicinchonique, un réactif colorigène spécifique pour le Cu(I). Les protéines placées en milieu alcalin réduisent le Cu(II) en Cu(I), et l'acide bicinchonique forme un complexe pourpre avec le Cu(I) ayant une absorbance optique maximale à 562 nm. Ainsi, la mesure de la concentration protéique de l'échantillon est proportionnelle à l'absorbance mesurée. Le kit contient une gamme étalon de BSA (*Bovine Serum Albumine*) d'une concentration en protéine allant de 2 mg/mL à 0,2 mg/mL qui a été resuspendu dans le même tampon que l'échantillon analysé. Le kit BCA contient aussi 2 réactifs, le *BCA reagent A* (contenant l'acide bicinchonique) et le *BCA reagent B* (contenant le sulfate de cuivre). Sur une plaque 96 puits ont été déposés 25 µL /puits les échantillons et la gamme étalon en duplicata. Par la suite 200 µL du mélange des réactifs A et B (1 volume de réactif B pour 50 volumes du réactif A) ont été ajoutés. La plaque a été incubée pendant 30 minutes sous agitation douce à 37°C. La lecture a été réalisée au spectrophotomètre en utilisant une absorbance de 562 nm.

3.3.5 Mesure du rayon hydrodynamique

La mesure du rayon hydrodynamique avec le zetasizer Nano ZS (ZEN3600) (Malvern™, Worcestershire, Angleterre) s'effectue en utilisant le principe de diffusion dynamique de la lumière, suite à l'émission du laser (laser rouge d'émission : 633 nm) dirigé vers les particules en suspension dans l'échantillon. Le rayon hydrodynamique est déterminé en prenant en compte le mouvement brownien de la particule à étudier, car plus la particule analysée est petite plus son mouvement brownien est intense. En tenant compte de la diffusion de la lumière et des mouvements browniens des particules en suspension dans un échantillon, le nanosizer nous renseigne sur la taille et la polydispersité des populations.

Les cuves en plastique, dans lesquelles ont été déposés 100 μL d'échantillon, ont été lues deux fois par le nanosizer à température pièce. Chaque mesure est représentée sous forme de graphique, affichant la taille des populations détectées par l'appareil sous forme de pics majeurs. Chaque échantillon a été mesuré deux fois, cela nous permet ainsi de conclure sur l'homogénéité ou l'hétérogénéité des VEs présentes dans les culots.

3.3.6 Gradient de vitesse à l'iodixanol

Le gradient de vitesse à l'iodixanol a permis de séparer les VEs dont les exosomes des particules virales (Cantin, Diou et al. 2008). Le gradient de vitesse était constitué de plusieurs fractions de différentes concentrations en iodixanol. Le gradient a été préparé dans des tubes ultracrimp (cat :79246 ; Thermo scientific, Asheville, Caroline du nord 28804, États-Unis) dans lesquels ont été déposés 900 μL des différentes fractions, allant de la plus concentrée à la moins concentrée (de 18% à 6%) (Cantin, Diou et al. 2008, Hubert, Subra et al. 2015). Ensuite, 800 μL d'échantillon ont été déposés sur le haut du gradient et les tubes ont été complétés avec du PBS. Ensuite, les tubes optisel ont été scellés avant d'être ultracentrifugés à 180 000 $\times g$ pendant 50 minutes avec l'ultracentrifugeuse *Sorvall WX Ultra Series centrifuge* (Thermo Fisher ScientificTM, Langensfeld, Allemagne) et le rotor 65V13. Une fois ultracentrifugée, chacune des fractions a été récupérée pour réaliser les différents tests souhaités (comme la mesure de l'activité AChE, le rayon hydrodynamique, le dosage protéique et l'immunobuvardage).

3.3.7 Immunobuvardage

Les fractions du gradient ont été mélangées à volume égal avec le *sample buffer Laemli* concentré 2 X (SB 2x) et incubées à 100 °C pendant 7 minutes. Les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) de 10% de polyacrylamide. Les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene Difluoridede) 0,45 μm pour un immunotransfert à 100 Volt. Une coloration au rouge de Ponceau a permis de s'assurer de la qualité du transfert. Les sites non spécifiques de la membrane ont ensuite été bloqués avec une solution

contenant du lait à 5% dans le tampon de TBS (*Tris Buffer Saline*)/Tween 20 0.1%. Les anticorps anti-Tsg101 (1/100), anti-CMH-I (1/100), anti-Alix (1/100) et Hsp70 (1/100) ont été dilués dans le tampon TBS/Tween 0,1% et incubés 1 heure avec la membrane. Ensuite, les membranes ont été lavées trois fois pendant 10 minutes avec le tampon TBS-Tween 0,1%, suivi de l'incubation avec l'anticorps secondaire pendant 45 minutes, un anticorps anti-souris couplé avec la horseradish peroxydase (HRP) dilué à 1/20 000 dans de l'*enhancer*. Les membranes ont été lavées trois fois avec le tampon TBS/T 0,1 % pendant 10 minutes. Les membranes ont ensuite été révélées avec le *luminata forte* incubé pendant 5 minutes dans le noir.

Chapitre 4 Résultats

4.1 Purification des microvésicules et des exosomes

L'objectif premier de ce travail était d'analyser séparément les MVs et les exosomes du plasma afin de déterminer quelle population de Vesp était enrichie en AChE. Pour se faire, les MVs ont été purifiées avec une centrifugation à 17 000 x g, puis les Vesp restantes dans le surnageant ont été précipitées avec le kit commercial ExoQuick™ tel que décrit précédemment. Une mesure de l'activité AChE a été réalisée (Figure 7 panel A) ainsi qu'une mesure du rayon hydrodynamique (Figure 7 panel B et C).

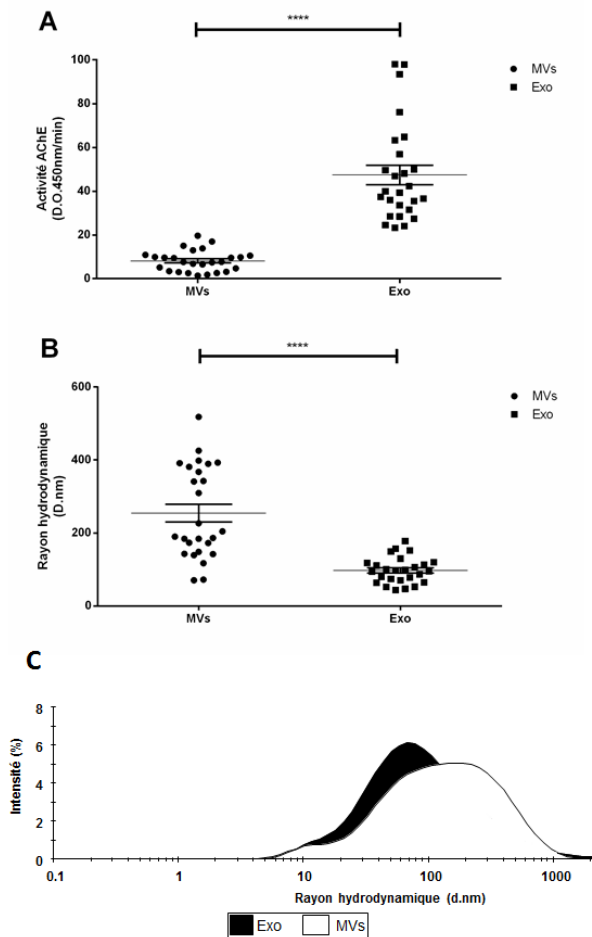


Figure 7. Comparaison de l'activité AChE et de la taille du rayon hydrodynamique entre les deux culots de Vesp purifiées.

Les plasmas déplaquetés des 26 échantillons de notre cohorte ont été centrifugés (Culot MVs) et précipités (culots Exo). L'activité AChE (A) et le rayon hydrodynamique (B) ont été mesurés pour chacun des culots. Les statistiques ont été calculées par un test T de student non apparié avec un intervalle de confiance $\alpha=0.05$; **** p<0.0001

Les résultats montrent que le culot enrichi en exosomes contient la majorité de l'activité AChE associée aux VEsp (Figure 7 panel A). La moyenne de l'activité AChE (D.O 450nm/minutes), dans les culots MVs est de 8.181 ± 4.836 et dans les culots Exo de 47.42 ± 22.41 . Nous pouvons voir que l'activité AChE est significativement supérieure dans les culots d'Exo par rapport aux culots MVs (A) (**** $p < 0.0001$).

Afin de valider que les tailles des deux types de VEsp purifiées correspondent bien à ce qui est décrit dans la littérature, la mesure des rayons hydrodynamiques a été réalisée. Les tailles moyennes des pics majeurs de chacun des échantillons sont présentées à la figure 7, panel B. Les MVs présentent un rayon hydrodynamique plus grand que celui des culots Exo ainsi qu'une plus grande hétérogénéité. Dans les culots MVs la taille moyenne des VEsp est de $254.3 \text{ d.nm} \pm 125.4$ et dans le culot Exo elle est de $97.38 \text{ d.nm} \pm 35.82$. La représentation graphique composée de tous les échantillons illustrés à la figure 7 panel C, montre la polydispersité des VEsp. Les culots MVs (courbe blanche) sont plus hétérogènes, que les culots Exo (courbe noir). La moyenne des rayons hydrodynamiques dans les culots de MVs est significativement plus grande que dans les culots Exo (**** $p < 0.0001$). La purification des vésicules plus grosses (MVs) avant la précipitation des plus petites, nous permet d'enrichir les VEsp AChE+ dans le culot Exo. De plus, ces VEsp AChE apparaissent comme une population de vésicules homogènes de petite taille proches de la description connues pour les exosomes.

4.2 Potentiel biomarqueur des VEsp AChE+ dans l'infection par le VIH-1

Le but de cette partie du projet était de caractériser la population de VEsp AChE+ définie ci-dessus dans l'infection par le VIH-1 afin de préciser son potentiel de biomarqueur. Les résultats obtenus précédemment ont été ré-analysés en fonction des 3 bras de notre cohorte (Tableau 1). Cette cohorte se compose de sujets contrôles (non infectés), de sujets infectés naïfs (sans ART) et de sujets infectés traités (aux ART). Le tableau 1 montre les paramètres cliniques des patients infectés, arborant des valeurs représentatives de la pathologie, soit un ratio CD4/CD8 inversé (inférieur à 1).

	Contrôles <i>n</i> = 8	Patients infectés VIH-1		
		Naïfs <i>n</i> = 6	Traités <i>n</i> = 12	
Charge virale copies/ml	-	79894 ± 118176	< 40	
Durée de l'infection (années)	-	5,03 ± 4,78	17,92 ± 8,41	
LT CD4 (Cellules/ μ l)	ND	735,5 ± 405	520,7 ± 108,7	
LT CD8 (Cellules/ μ l)	ND	1302 ± 926,7	770 ± 408,1	
Ratio CD4/CD8	ND	0,6117 ± 0,1867	0,8283 ± 0,3544	
Neutrophiles (1.E9/L)	ND	3,17 ± 0,52	3,13 ± 1,03	
Monocytes (1.E9/L)	ND	0,65 ± 0,27	0,45 ± 0,17	
Plaquettes (1.E9/L)	ND	208,3 ± 50,38	181,9 ± 66,36	
Âge (années)	44,75 ± 9,67	43,33 ± 14,53	52,67 ± 12,98	
Genre n (%)	femme	4 (57%)	1 (17%)	0 (0%)
	homme	3 (43%)	5 (83%)	12 (100%)

Les paramètres cliniques sont reportés en moyenne avec la déviation standard (SD).

Tableau 1. Données cliniques de la cohorte de patients atteints du VIH-1+ étudiée.

Les différents paramètres cliniques des patients provenant de la cohorte du Docteur Sylvie Trottier sont regroupés sous les différents bras de de la cohorte, contrôles naïfs et traités.

Nous avons purifié les VEsp des patients de la cohorte pour déterminer si les VEsp AChE+ des culots Exo sont plus abondantes chez les patients infectés et plus particulièrement chez les patients naïfs (Figure 8). L'activité AChE ainsi que la taille des rayons hydrodynamiques ont été mesurées dans les deux culots entre les 3 groupes de patients.

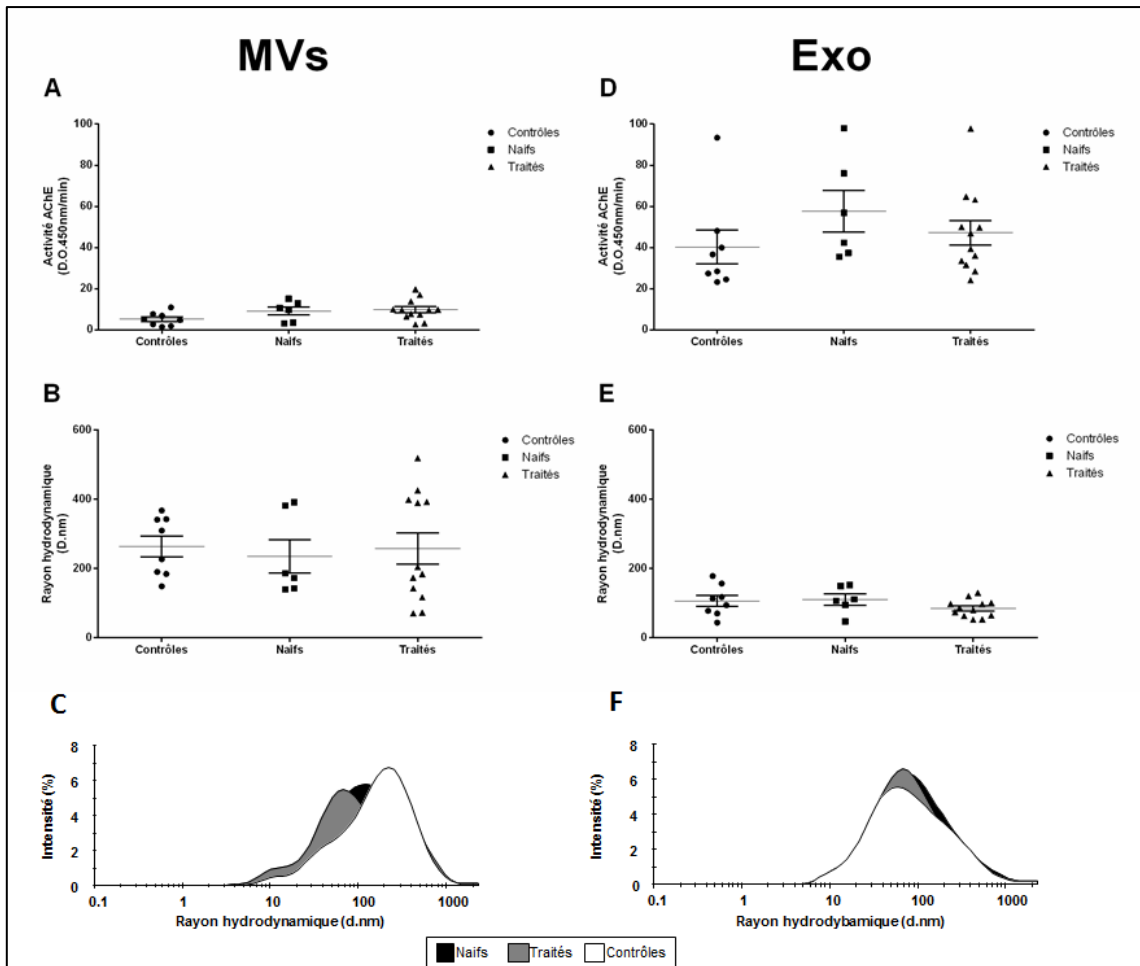


Figure 8. Caractérisation de l'activité AChE et du rayon hydrodynamique des VEsps dans les différents bras de la cohorte.

Les plasmas déplaquetés viennent de patients sains (n=8), infectés sans ART naïfs (n=6) et infectés traités au ART (n=12). Les VEsps sont précipitées en un culot MVs et un culot Exo. L'activité AChE et le rayon sont comparés entre les bras de la cohorte dans les MVs (A, B) et les Exo (C, D, E et F).

Dans les culots MVs, la quantité d'AChE détectée est faible et ne varie pas entre les bras de la cohorte (Figure 8 panel A). En effet, l'activité AChE (exprimée en D.O.450nm/minutes) des sujets contrôles est de 5.141 ± 3.237 , chez les naïfs de 9.138 ± 4.924 et les traités de 9.729 ± 5.032 . Toutefois, on remarque une très légère hausse chez les patients infectés par rapport aux contrôles. Tandis que dans les culots Exo, les activités AChE ont une tendance à l'augmentation chez les patients infectés (Figure 8 panel D). L'activité AChE moyenne chez les sujets contrôles est de 40.20 ± 23.13 , chez les naïfs de 57.68 ± 24.93 et pour les traités de 47.10 ± 20.56 . On remarque que cette hausse d'activité est plus prononcée chez les patients infectés naïfs par rapport aux traités.

Entre les différents bras de la cohorte, les rayons hydrodynamiques des VEsp du culot MVs diminuent légèrement et sont plus variables chez les individus infectés (Figure 8 panel B). Dans les culots MVs la moyenne de la taille des VEsp chez les sujets contrôles est de $263.8 \text{ d.nm} \pm 85.75$, chez les naïfs de $235.5 \text{ d.nm} \pm 118.2$ et de $257.5 \text{ d.nm} \pm 156.4$ pour les traités. Cette légère diminution est visible également par le déplacement du pic majeur dans le graphique illustrant les rayons hydrodynamiques moyen chez les patients infectés (Figure 8 panel C). Nous pouvons voir qu'il y a plus d'hétérogénéité dans les tailles des VEsp présentes dans les culots MVs entre les différents bras de la cohorte. Cette hétérogénéité semble plus prononcée chez les patients infectés traités. Dans le culot Exo, le rayon hydrodynamique des VEsp ne varie pas entre les différents bras de la cohorte (Figure 8 panel E). Dans les culots Exo, la moyenne de la taille des VEsp chez les sujets contrôles est de $106.4 \text{ d.nm} \pm 44.80$, de $110.2 \text{ d.nm} \pm 38.97$ chez les naïfs et $84.96 \text{ d.nm} \pm 25.13$ pour les traités. Une légère diminution de la taille des VEsp est visible chez les patients traités. Toutefois, entre chaque bras de la cohorte, les populations de petites VEsp semblent conserver leur homogénéité comme le représente le chevauchement des pics dans le graphique illustrant les rayons hydrodynamiques (Figure 8 panel F).

La polydispersité des VEsp dans les culots MVs est plus grande chez les patients infectés et surtout chez les patients traités. La population de VEsp AChE+ des culots Exo est une population homogène de petites vésicules qui tendent à être plus abondantes chez les patients infectés. Cette augmentation est plus prononcée chez les patients naïfs.

Pour valider si cette population de VEsp possède un potentiel de biomarqueur de l'infection par le VIH-1, les corrélations entre les paramètres cliniques des patients et l'activité AChE ont été calculées (Tableau 2).

	HIV-1 +		
	Naïfs n = 6	Traités n = 12	HIV+ (Naïfs + Traités) n = 18
MVs			
Charge virale (log10 copies/ml)	r= -0,6 ; p= 0,2417	-	-
temps d'infection	r= 0,0882 ; p= 0,9194	r= 0,4183 ; p= 0,176	r=0,2152 ; p= 0,3911
CD4 (cell/µl)	r= 0,2571 ; p= 0,6583	r= -0,0699 ; p= 0,829	r= 0,0691 ; p= 0,7851
CD8 (cell/µl)	r= -0,1429 ; p= 0,8028	r= 0,5105 ; p= 0,0899	r= 0,2982 ; p= 0,2293
CD4/CD8 ratio	r= 0,4286 ; p= 0,4194	r= -0,4273 ; p= 0,1659	r=-0,2183 ; p= 0,3841
Neutrophiles (1.E9/L)	r= 0,0289 ; p= 1,0	r= 0,4327 ; p= 0,1601	r= 0,3821 ; p= 0,1176
Monocytes (1.E9/L)	r= 0,2319 ; p= 0,6583	r= 0,2818 ; p= 0,3748	r= 0,3162 ; p= 0,2011
Plaquettes (1.E9/L)	r= -0,4857 ; p= 0,3556	r= 0,1958 ; p= 0,5419	r= -0,0691 ; p= 0,7851
Âge (années)	r= -0,2319 ; p= 0,6583	r= 0,3481 ; p= 0,2676	r= 0,1775 ; p= 0,4811
	spearman	spearman	spearman
Exo			
Charge virale (log10 copies/ml)	r= 0,7143 ; p= 0,1361	-	-
temps d'infection	r= -0,7945 ; p= 0,0583	r= -0,2246 ; p= 0,4829	r= -0,4304 ; p= 0,0746
CD4 (cell/µl)	r= 0,1429 ; p= 0,8028	r= 0,0686 ; p= 0,8322	r= 0,0381 ; p= 0,8804
CD8 (cell/µl)	r= 0,5429 ; p= 0,2972	r= 0,1085 ; p= 0,7372	* r= 0,4840 ; p= 0,0418
CD4/CD8 ratio	r= -0,3143 ; p= 0,5639	r= -0,2578 ; p= 0,4186	* r= -0,4708 ; p= 0,0486
Neutrophiles (1.E9/L)	r= -0,0579 ; p= 0,9194	r= 0,2691 ; p= 0,3977	r= 0,3644 ; p= 0,1371
Monocytes (1.E9/L)	r= 0,116 ; p= 0,8028	r= 0,0793 ; p= 0,8064	r= 0,1929 ; p= 0,4432
Plaquettes (1.E9/L)	r= 0,1429 ; p= 0,8028	r= 0,5157 ; p= 0,0862	* r= 0,5439 ; p= 0,0196
Âge (années)	r= 0,5508 ; p= 0,2972	r= 0,0830 ; p= 0,7975	r= -0,0198 ; p= 0,9377
	spearman	pearson	spearman

Tableau 2. Corrélation entre l'activité AChE des VEsp purifiées et les paramètres cliniques des patients.

Les corrélations sont exprimées sous le coefficient r de Spearman ou Pearson et de la valeur p bilatérale. L'utilisation de la corrélation de Spearman ou Pearson est déterminée via un test de normalité d'Agostino et Pearson.

Le tableau 2 montre des corrélations avec l'activité AChE uniquement dans le culot Exo. Chez les patients infectés (Naïfs + Traités) l'activité AChE mesurée dans les culots Exo corrèle positivement (*r= 0.5439 ; p= 0.0196) avec les plaquettes et la quantité de lymphocytes T CD8 (*r= 0.4840 ; p= 0.0418). Elle corrèle négativement avec le ratio CD4/CD8 (*r= -0.4708 ; p=0.0486). Le ratio CD4/CD8 est le principal biomarqueur accepté de la maladie du VIH-1. Cette corrélation met en évidence le potentiel des Exo comme biomarqueur dans la pathologie du VIH-1.

La population de VEsp AChE+ que nous avons enrichie en la séparant des grosses vésicules, corrèle avec le marqueur de la progression de la maladie. Nous avons vu que la

population de VEsp AChE+ chez les patients infectés tend à être augmentée. Nous supposons que cette population de VEsp AChE+ serait des exosomes et pour vérifier cela le gradient de vélocité a été utilisé.

4.3 Caractérisation des VEsp AChE+ par gradient de vélocité

La caractérisation de cette population de VEsp AChE+ permettra de valider si les VEsp AChE+ contiennent d'autres marqueurs d'exosomes et si ce culot exo contient des protéines ou des agrégats protéiques contaminants. Pour se faire, les VEsp ont été séparées avec le gradient de vélocité à l'iodixanol, utilisé pour la séparation des VEsp et des particules virales (Cantin, Diou et al. 2008). Pour caractériser la capacité du gradient de vélocité à purifier les VEsp AChE+, les VEsp d'un individu sain ont été précipitées en un culot MVs et un culot Exo, puis le culot Exo a été déposé sur un gradient de vélocité. La répartition de l'activité AChE, des rayons hydrodynamiques et des protéines dans les fractions du gradient a été mesurée (Figure 9).

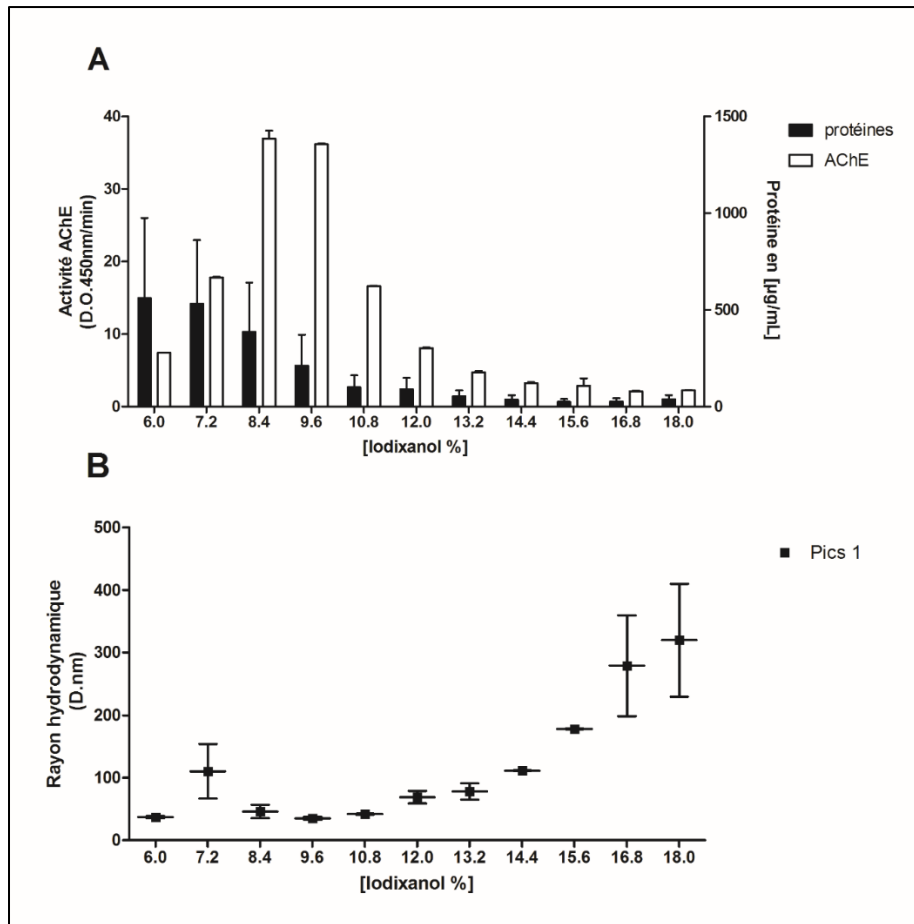


Figure 9. Caractérisation de l'activité AChE, de la concentration protéique et du rayon hydrodynamique des VEsp séparées dans les fractions du gradient de vitesse.

Les VEsp ont été précipitées à partir du surnageant d'un culot MVs avec le kit Exoquick™. Les VEsp du culot Exo sont déposées sur un gradient de vitesse à l'iodixanol. Les fractions du gradient ont été mesurées en duplicata pour l'activité AChE (panel A), le dosage protéique (Test BCA) (Panel A) et pour la mesure du rayon hydrodynamique (panel B). A) Les boites noires représentent la concentration protéique des fractions (échelle de droite), tandis que les blanches représentent l'activité AChE (échelle de gauche). Cette illustration est représentative d'au moins trois expériences différentes.

On observe que le gradient de vitesse permet d'enrichir la population de VEsp AChE+ entre les fractions 7.2% et 10.8% (Figure 9 panel A), avec une plus forte activité AChE dans les fractions 8.4% (36.91 ± 1.09) et 9.6% (36.16 ± 0.11). Pour évaluer les protéines associées ou non aux VEsp, la répartition des protéines dans les fractions du gradient a été mesurée avec un test BCA (Figure 9 panel A). Les protéines sont plus concentrées dans les premières fractions 6% ($560.77 \mu\text{g/mL} \pm 414.47$) et 7.2% ($531.18 \mu\text{g/mL} \pm 328.68$), puis

leur quantité diminue dans les fractions suivantes. Les fractions contenant le plus d'AChE ont une concentration protéique de $385.23 \mu\text{g/mL} \pm 255.6$ pour la fraction 8.4% et $210.83 \mu\text{g/mL} \pm 161.05$ pour la fraction 9.6%.

La mesure des rayons hydrodynamiques illustrée dans la figure 9 panneau B montre bien la présence de VEsp de tailles similaires aux exosomes dans les fractions AChE+ positives. Les fractions contenant les activités AChE révèlent des tailles de $110.37 \pm 43.73 \text{ nm}$ dans la fraction 7.2%, $46.10 \text{ nm} \pm 10.47$ dans la 8.4%, $35.17 \text{ nm} \pm 2.04$ pour la 9.6% et $41.9 \text{ nm} \pm 0.82$ pour la 10.8%.

Le gradient de vélocité permet de purifier les VEsp AChE+ dans les fractions 8.4% et 9.6% du gradient, ici en les séparant des protéines solubles plasmatiques (6% et 7.2%). La taille des rayons hydrodynamiques est similaire à une taille d'exosomes et montre une population de vésicules homogène dans les fractions AChE+.

La présence du marqueur de l'AChE et la taille des VEsp renforcent l'idée que les VEsp AChE+ seraient une population d'exosomes. Afin de poursuivre cette validation, un immunobuvardage pour les marqueurs vésiculaires connus et décrits pour être enrichis dans les exosomes a été réalisé. Les marqueurs comme le Tsg101, Alix sont des marqueurs de la population des exosomes. Nous avons également utilisé Hsp70 et CMH-I, des marqueurs enrichis dans les VEsp (Figure 10).

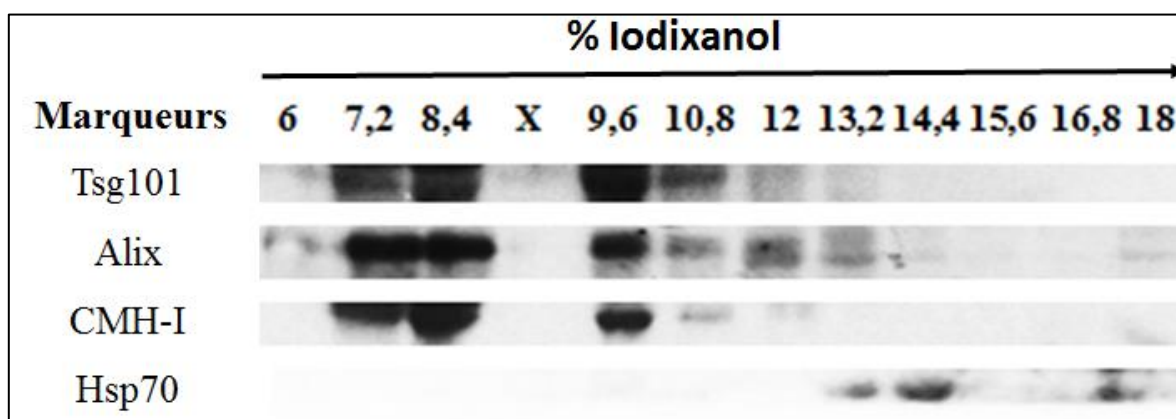


Figure 10. Caractérisation des marqueurs protéiques des VEsp dans les fractions du gradient de vélocité.

Les VEsp d'un donneur sain ont été précipitées avec le kit ExoQuick™ puis déposées sur un gradient de vélocité à l'iodixanol. Le gradient a été ultracentrifugé 50 minutes à $100\ 000 \times g$, puis les fractions du gradient analysées par immunobuvardage pour des marqueurs vésiculaires. La colonne X représente un espace vide.

La protéine Tsg101 est visible dans les fractions 7.2 % à 10.8%. La protéine Alix se retrouve fortement dans les fractions 7.2% à 9.6% et est présent dans les fractions 10.8% à 13.2%. Le marqueur du CMH-I est fortement exprimé dans les fractions 7.2% à 9.6% et légèrement présent dans la fraction 10.8%. Pour ce qui est d'Hsp70, celui-ci se retrouve dans les fractions 13.2% et 14.4%. Les fractions contenant les VEsp AChE+ sont enrichies en marqueurs de l'immunité (CMH-I), et en marqueurs d'exosomes (Tsg101 et Alix). De plus, Hsp70 est absent des fractions AChE+ ce qui nous permet de voir une répartition de différentes sous-populations de VEsp dans le gradient. Le gradient nous permet de purifier les VEsp AChE+ et les marqueurs nous permettent de voir une répartition des différentes populations de VEsp dans le gradient. De plus, les différents marqueurs Alix, Tsg101, l'AChE et les rayons hydrodynamiques valident que les VEsp AChE+ sont une population d'exosomes AChE+.

Chapitre 5 Discussion

Les VE sont facilement accessibles dans le plasma (Caby, Lankar et al. 2005), et leur contenu riche en protéines ou ARN, font de ces VE de bons biomarqueurs de la progression de diverses pathologies (Huang, Yuan et al. 2013, Kalra, Adda et al. 2013, Properzi, Logozzi et al. 2013, Ridder, Keller et al. 2014). La caractérisation des VEsp des patients infectés par le VIH-1 pourrait à long terme nous renseigner sur la progression de la maladie et l'efficacité des traitements mais aussi sur les désordres immunologiques associés à l'infection. L'étude des VEsp chez des patients infectés par le VIH-1 a montré le potentiel biomarqueur des VEsp (Hubert, Subra et al. 2015, Dreyer and Baur 2016, Konadu, Huang et al. 2016). Pour approfondir ce potentiel, les VEsp ont été séparées et analysées en deux populations distinctes. Ainsi la population de VEsp AChE+ a été identifiée comme étant des exosomes. Quelques corrélations ont été obtenues notamment entre l'activité AChE et le compte de plaquettes et de lymphocytes T CD8 ainsi qu'une corrélation négative avec le ratio CD4/CD8.

5.1 Caractérisation de la population d'exosomes AChE+

La première précipitation a permis de séparer les grosses vésicules (MVs) des petites vésicules (les exosomes) comme le montre la figure 7. L'obtention de ces deux culots a permis d'enrichir spécifiquement la population AChE+. Cependant la précipitation des VE du plasma avec le kit Exoquick™ co-précipite des agrégats protéiques. En effet le plasma contient de nombreuses protéines plasmatiques (e.g, albumine, immunoglobuline, fibrogène, HDL LDL) (Shen, Kim et al. 2005), qui peuvent être co-précipitées avec les VEsp. Ces co-contaminants affectent ainsi la pureté des VEsp purifiées par ultracentrifugation (Van Deun, Mestdagh et al. 2014, Zonneveld, Brisson et al. 2014). Afin de valider que cette population de VEsp AChE+ soit bien des exosomes, elles ont été séparées avec le gradient de vélocité à l'iodixanol. Le gradient de vélocité permet de réduire le risque de co-contaminant car il peut séparer les VEsp des agrégats protéiques comme le montre la répartition de la quantité de protéine et du rayon hydrodynamique dans le gradient (Figure 9). En plus de séparer les agrégats protéiques, le gradient permet de

séparer les exosomes des particules virales (Cantin, Diou et al. 2008). Dans les fractions contenant les VEsp AChE+ les marqueurs Tsg101, Alix et CMH-1 sont retrouvés enrichis. Ceci permet d'avancer que les VEsp AChE+ sont une population d'exosomes car on retrouve des tailles d'exosomes (Figure 9), et les marqueurs de la biogénèse des exosomes (Tsg101, Alix (Mathivanan, Fahner et al. 2012)) (Figure 10). Le gradient peut séparer les exosomes AChE+ des autres vésicules car les tailles dans les dernières fractions indiquent la présence de vésicules non caractérisées et plus grosses (Figure 9). Entre autres, le marqueur Hsp70 est enrichi dans les fractions contenant des vésicules plus grosses et est absent dans les fractions AChE+ (Figure 10). Les populations de vésicules sont hétérogènes et les marqueurs sont répartis différemment dans ces populations (Kowal, Arras et al. 2016). Le gradient de vitesse sépare les exosomes AChE+ des autres populations vésiculaires plus larges ainsi que les particules virales et les agrégats protéiques.

5.2 Exosomes AChE+ dans l'infection par le VIH-1

Tout comme dans l'étude de Hubert et coll. l'augmentation des exosomes AChE+ a été observée chez les patients infectés, surtout chez les patients naïfs, sans, cependant, atteindre la significativité (Figure 8). En comparaison de la cohorte étudiée dans l'article de Hubert et coll. (Hubert, Subra et al. 2015), la présente cohorte est composée de moins de patients. Les patients infectés naïfs ne se ressemblent pas entre les deux cohortes. En effet, les patients naïfs de présente cohorte possèdent une durée d'infection d'environ 5 ans qui est plus longue que l'ancienne qui ne rassemblait que des patients infectés depuis moins d'un an. La progression de l'infection chez les patients naïfs est hétérogène puisque certains sont infectés depuis 10 ans, d'autres 1 an et même un patient depuis moins d'un an. Cette différence est visible également par la charge virale détectée chez les patients naïfs qui est aussi très hétérogène allant de 60 copies/mL à 266 413 copies/mL, ce qui indique une activité de réplication différente. Le patient infecté depuis moins d'un an possède la charge virale la plus élevée, 266 413 copies/mL, qui est due à une réplication virale intense suite à la primo-infection. Chez les deux patients infectés depuis plus de 10 ans, l'un d'eux possède une charge virale de 5608 copies/mL et un ratio CD4/CD8 de 0.44, et l'autre de 60 copies/mL et un ratio CD4/CD8 de 0.91. Après 10 années d'infection, le ratio CD4/CD8

demeure proche de 1 et la charge virale de 60 copies/mL est à la limite du seuil de détection de 40 copies/mL. Ce patient possède des caractéristiques cliniques et une activité AChE de ses VEsp proches de celles des contrôles et des élites contrôleurs de l'ancienne étude. Les élites contrôleurs sont des individus infectés capables de contrôler la charge virale par eux-mêmes sans nécessiter de traitement. Leur système immunitaire arrive à contrôler l'infection visible par le ratio CD4/CD8 proche ou supérieur à 1. De plus, la charge virale dans le sang de ces patients est proche du seuil de détection (Okulicz and Lambotte 2011, Crowell and Hatano 2015). Dans la cohorte utilisée dans Hubert et coll. les VEsp de 14 patients élites contrôleurs ont été analysées et les résultats étaient comparables aux contrôles, différents de notre cohorte qui possède un patient proche des patients contrôles dont les VEsp ont été analysées avec les sujets naïfs. Les marqueurs cliniques (charge virale, ratio CD4/CD8, durée d'infection) montrent bien l'hétérogénéité de la cohorte dans la progression de l'infection. Ces différences dans les deux cohortes ont une similitude dans la tendance à l'augmentation des exosomes AChE+ et corrélient négativement avec le ratio CD4/CD8 et positivement avec le compte de lymphocytes T CD8.

La corrélation des exosomes AChE+ avec le ratio CD4/CD8 renforce leur potentiel de biomarqueur et il serait pertinent de caractériser leur contenu pour renforcer leur utilisation comme marqueurs de l'infection. Les travaux de Hubert et coll. ont montré que les VEsp de patients naïfs sont enrichies en micro ARN et que le mir223 et le mir155 corrélient fortement avec l'activité AChE. Il serait pertinent d'observer la répartition des micro ARN dans les fractions du gradient et voir lesquels sont enrichis dans les exosomes AChE+. Il est décrit que les exosomes sont une population de vésicules enrichies en micro ARN, et cette source de micro ARN permettent de les exploiter comme biomarqueurs dans l'infection par le VIH-1 comme c'est le cas pour différents cancers, par exemple le liposarcome (Casadei, Creighton et al. 2016). Il est également possible de trouver des micro ARN viraux dans les VEsp, par exemple *vmiRTAR*, *vmiR88* et *vmiR99* (Bernard, Zhao et al. 2014), qui ont été détectés dans le sang de patients infectés et dans des cultures cellulaires infectées par le VIH-1. La détection de micro ARN dans les exosomes AChE+ permettrait peut-être de découvrir la présence de micro ARN ayant le potentiel d'influencer les réponses immunitaires et pourraient améliorer le suivi de la progression de l'infection mais aussi de l'état d'activation des populations cellulaires.

La corrélation des exosomes AChE+ avec le compte de lymphocytes T CD8, renforce également le potentiel biomarqueur de cette population comme suivi de la progression de la maladie en lien avec une des populations cellulaires connues pour son rôle dans l'infection. Une mesure des vésicules provenant des lymphocytes T CD8 PD-1 (*Programmed Cells Death*) positive pourrait être pertinente. En effet l'épuisement des lymphocytes T CD8 au cours de l'infection du VIH-1 se caractérise par l'expression de molécules, comme le PD-1 qui corrèle avec la perte de fonctionnalité de ces cellules ainsi qu'avec certains marqueurs de progression de la maladie tels que la charge virale et le nombre de lymphocytes T CD4 (Day, Kaufmann et al. 2006, Trautmann, Janbazian et al. 2006, Hoffmann, Pantazis et al. 2016).

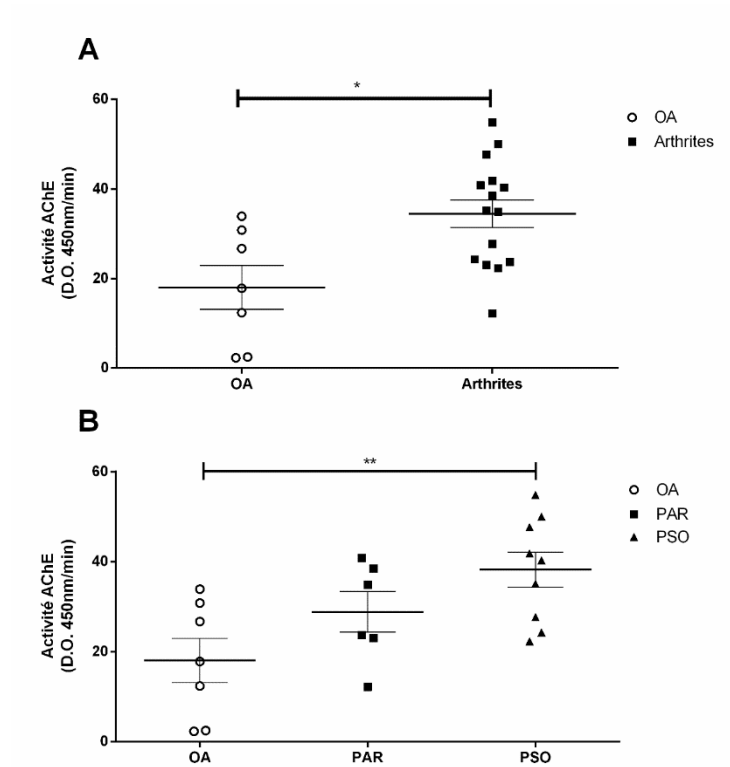
5.3 Les exosomes AChE+ dans différentes pathologies ou différents fluides

Nous avons montré que notre méthode de séparation des MVs et des exosomes permet d'enrichir la population d'exosomes AChE+. Cette méthode est applicable dans différents fluides et différentes pathologies. Afin de le vérifier nous avons caractérisé en collaboration avec le Dr. Patrice Poubelle les exosomes AChE+ dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite. (Annexe 1). Chez les patients atteints d'arthrite psoriasique, les exosomes AChE+ étaient significativement augmentés, et les marqueurs protéiques Alix et *Lysosomal-associated membrane protein-2* (Lamp-2) étaient enrichis chez ces patients. Cette procédure a aussi été réalisée dans le cancer de la prostate et a montré une augmentation des exosomes AChE+. Cette façon de faire, applicable dans d'autres pathologies et d'autres fluides nous montre le potentiel des exosomes pour la caractérisation et le suivi de la progression de diverses pathologies. En effet leur rôle biomarqueur des exosomes a déjà été décrit dans le cancer (Hosseini-Beheshti, Pham et al. 2012, Kumar, Gupta et al. 2015, Casadei, Creighton et al. 2016) et les maladies neurodégénératives (Saman, Kim et al. 2012, Hamlett, Goetzl et al. 2016) suggérant leur potentiel de biomarqueur dans plusieurs pathologies.

Chapitre 6 Conclusion

Durant cette étude, nous avons optimisé la purification des VEsp AChE+ en séparant les grosses vésicules des petites. Ce moyen rapide et peu coûteux permet de séparer les VEsp AChE+, et la caractérisation que nous en avons fait permet de les identifier comme une population d'exosomes. Par rapport à l'étude antérieure, provenant de notre laboratoire nous avons montré que cette population pourrait jouer un rôle de biomarqueur dans l'infection par le VIH-1 et peut-être aussi dans d'autres pathologies. Ces exosomes AChE+ pourraient servir d'outils dans le diagnostic/pronostic de l'infection, et renseigner sur l'épuisement des lymphocytes T CD8 un mécanisme clé dans la pathologie qui n'est pas complètement restauré par les traitements aux ART. En plus de ces applications, les exosomes AChE+ pourraient également jouer un rôle d'outils thérapeutiques dans l'infection par le VIH-1 (Teow, Nordin et al. 2016). En effet, dans l'infection par le VIH-1, les exosomes de différents fluides (sang, semence, et lait maternel) ont montré des rôles anti-viraux (Madison, Roller et al. 2014, Smith and Daniel 2016).

Annexe



Annexe 1. Évaluation des exosomes AChE+ dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrites.

Les exosomes AChE+ ont été purifiés dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite ou d'ostéoarthrose. La mesure de l'activité AChE a été réalisée chez les patients atteints d'ostéoarthrose (A), de polyarthrite rhumatoïde (PAR) et d'arthrite psoriasique (PSO). A) Test bivalent non apparié de student avec un intervalle de confiance $\alpha=0.05$ et B) *OneWay ANOVA* intervalle de confiance $\alpha=0.05$.

Références

- Aalberts, M., F. M. van Dissel-Emiliani, N. P. van Adrichem, M. van Wijnen, M. H. Wauben, T. A. Stout and W. Stoorvogel (2012). "Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans." Biology of reproduction **86**(3): 82.
- Aass, H. C., R. Ovstebo, A. M. Troseid, P. Kierulf, J. P. Berg and C. E. Henriksson (2011). "Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis." Cytometry A **79**(12): 990-999.
- Admyre, C., J. Grunewald, J. Thyberg, S. Gripenback, G. Tornling, A. Eklund, A. Scheynius and S. Gabrielsson (2003). "Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid." Eur Respir J **22**(4): 578-583.
- Admyre, C., S. M. Johansson, S. Paulie and S. Gabrielsson (2006). "Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT." Eur J Immunol **36**(7): 1772-1781.
- Aga, M., G. L. Bentz, S. Raffa, M. R. Torrisi, S. Kondo, N. Wakisaka, T. Yoshizaki, J. S. Pagano and J. Shackelford (2014). "Exosomal HIF1alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes." Oncogene **33**(37): 4613-4622.
- Al-Nedawi, K., B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha and J. Rak (2008). "Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells." Nat Cell Biol **10**(5): 619-624.
- Alizon, M. and L. Montagnier (1986). "Lymphadenopathy/AIDS virus: genetic organization and relationship to animal lentiviruses." Anticancer Res **6**(3 Pt B): 403-411.
- Alonso, R., C. Mazzeo, M. d. C. Rodríguez, M. Marsh, A. Fraile-Ramos, V. Calvo, A. Avila-Flores, I. Merida and M. Izquierdo (2011). "Diacylglycerol kinase α regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes." Cell Death & Differentiation **18**(7): 1161-1173.
- Arenaccio, C., S. Anticoli, F. Manfredi, C. Chiozzini, E. Olivetta and M. Federico (2015). "Latent HIV-1 is activated by exosomes from cells infected with either replication-competent or defective HIV-1." Retrovirology **12**(1): 1.
- Arenaccio, C., C. Chiozzini, S. Columba-Cabezas, F. Manfredi, E. Affabris, A. Baur and M. Federico (2014). "Exosomes from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells license quiescent CD4+ T lymphocytes to replicate HIV-1 through a Nef-and ADAM17-dependent mechanism." Journal of virology **88**(19): 11529-11539.
- Arenaccio, C., C. Chiozzini, S. Columba-Cabezas, F. Manfredi and M. Federico (2014). "Cell activation and HIV-1 replication in unstimulated CD4+ T lymphocytes ingesting exosomes from cells expressing defective HIV-1." Retrovirology **11**: 46.
- Arita, S., E. Baba, Y. Shibata, H. Niuro, S. Shimoda, T. Isobe, H. Kusaba, S. Nakano and M. Harada (2008). "B cell activation regulates exosomal HLA production." Eur J Immunol **38**(5): 1423-1434.
- Ariza, M. E., P. Rivaille, R. Glaser, M. Chen and M. V. Williams (2013). "Epstein-Barr virus encoded dUTPase containing exosomes modulate innate and adaptive immune responses in human dendritic cells and peripheral blood mononuclear cells." PLoS One **8**(7): e69827.
- Balaj, L., N. A. Atai, W. Chen, D. Mu, B. A. Tannous, X. O. Breakefield, J. Skog and C. A. Maguire (2015). "Heparin affinity purification of extracellular vesicles." Sci Rep **5**: 10266.
- Balaj, L., R. Lessard, L. Dai, Y. J. Cho, S. L. Pomeroy, X. O. Breakefield and J. Skog (2011). "Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences." Nat Commun **2**: 180.

- Bellingham, S. A., B. M. Coleman and A. F. Hill (2012). "Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells." Nucleic Acids Res **40**(21): 10937-10949.
- Bellone, M., G. Iezzi, P. Rovere, G. Galati, A. Ronchetti, M. P. Protti, J. Davoust, C. Rugarli and A. A. Manfredi (1997). "Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes." J Immunol **159**(11): 5391-5399.
- Berda-Haddad, Y., S. Robert, P. Salers, L. Zekraoui, C. Farnarier, C. A. Dinarello, F. Dignat-George and G. Kaplanski (2011). "Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(51): 20684-20689.
- Bernard, M. A., H. Zhao, S. C. Yue, A. Anandaiah, H. Koziel and S. D. Tachado (2014). "Novel HIV-1 miRNAs stimulate TNF α release in human macrophages via TLR8 signaling pathway." PLoS One **9**(9): e106006.
- Besse, B., M. Charrier, V. Lapierre, E. Dansin, O. Lantz, D. Planchard, T. Le Chevalier, A. Livartoski, F. Barlesi and A. Laplanche (2016). "Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC." Oncoimmunology **5**(4): e1071008.
- Bhatnagar, S., K. Shinagawa, F. J. Castellino and J. S. Schorey (2007). "Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo." Blood **110**(9): 3234-3244.
- Bianco, N. R., S. H. Kim, M. A. Ruffner and P. D. Robbins (2009). "Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2, 3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models." Arthritis & Rheumatism **60**(2): 380-389.
- Bicalho, B., J. L. Holovati and J. P. Acker (2013). "Phospholipidomics reveals differences in glycerophosphoserine profiles of hypothermally stored red blood cells and microvesicles." Biochim Biophys Acta **1828**(2): 317-326.
- Black, L. V., S. C. Saunderson, F. P. Coutinho, M. R. Muhsin-Sharafaldine, T. T. Damani, A. C. Dunn and A. D. McLellan (2016). "The CD169 sialoadhesin molecule mediates cytotoxic T-cell responses to tumour apoptotic vesicles." Immunol Cell Biol **94**(5): 430-438.
- Blanchard, N., D. Lankar, F. Faure, A. Regnault, C. Dumont, G. Raposo and C. Hivroz (2002). "TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex." J Immunol **168**(7): 3235-3241.
- Bobrie, A. and C. Théry (2013). "Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal?" Biochemical Society Transactions **41**(1): 263-267.
- Boing, A. N., E. van der Pol, A. E. Grootemaat, F. A. Coumans, A. Sturk and R. Nieuwland (2014). "Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography." J Extracell Vesicles **3**.
- Booth, A. M., Y. Fang, J. K. Fallon, J. M. Yang, J. E. Hildreth and S. J. Gould (2006). "Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane." J Cell Biol **172**(6): 923-935.
- Borges, F. T., L. A. Reis and N. Schor (2013). "Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases." Braz J Med Biol Res **46**(10): 824-830.
- Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw and M. B. Oldstone (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **68**(9): 6103-6110.
- Boshoff, C. and R. Weiss (2002). "AIDS-related malignancies." Nat Rev Cancer **2**(5): 373-382.
- Brouwers, J. F., M. Aalberts, J. W. Jansen, G. van Niel, M. H. Wauben, T. A. Stout, J. B. Helms and W. Stoorvogel (2013). "Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes." Proteomics **13**(10-11): 1660-1666.

- Busch, A., T. Quast, S. Keller, W. Kolanus, P. Knolle, P. Altevogt and A. Limmer (2008). "Transfer of T cell surface molecules to dendritic cells upon CD4+ T cell priming involves two distinct mechanisms." The Journal of Immunology **181**(6): 3965-3973.
- Caby, M.-P., D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo and C. Bonnerot (2005). "Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma." International immunology **17**(7): 879-887.
- Cai, J., G. Wu, X. Tan, Y. Han, C. Chen, C. Li, N. Wang, X. Zou, X. Chen, F. Zhou, D. He, L. Zhou, P. A. Jose and C. Zeng (2014). "Transferred BCR/ABL DNA from K562 extracellular vesicles causes chronic myeloid leukemia in immunodeficient mice." PLoS One **9**(8): e105200.
- Cantin, R., J. Diou, D. Belanger, A. M. Tremblay and C. Gilbert (2008). "Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants." J Immunol Methods **338**(1-2): 21-30.
- Casadei, L., C. Creighton, K. Batte, D. Chelouche-Lev, C. M. Croce and R. E. Pollock (2016). "Circulating exosomal miRNAs as potential biomarker in liposarcoma." Cancer Research **76**(14 Supplement): 966-966.
- Cassan, E., A. M. Arigon-Chifolleau, J. M. Mesnard, A. Gross and O. Gascuel (2016). "Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Cazzoli, R., F. Buttitta, M. Di Nicola, S. Malatesta, A. Marchetti, W. N. Rom and H. I. Pass (2013). "microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer." Journal of Thoracic Oncology **8**(9): 1156-1162.
- Chaput, N., N. E. Scharz, F. André, J. Taïeb, S. Novault, P. Bonnaventure, N. Aubert, J. Bernard, F. Lemonnier and M. Merad (2004). "Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection." The Journal of Immunology **172**(4): 2137-2146.
- Chen, X., L. Hui, N. H. Geiger, N. J. Haughey and J. D. Geiger (2013). "Endolysosome involvement in HIV-1 transactivator protein-induced neuronal amyloid beta production." Neurobiol Aging **34**(10): 2370-2378.
- Chun, T.-W., D. C. Nickle, J. S. Justement, J. H. Meyers, G. Roby, C. W. Hallahan, S. Kottlilil, S. Moir, J. M. Mican and J. I. Mullins (2008). "Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy." Journal of Infectious Diseases **197**(5): 714-720.
- Cicala, C. and J. Arthos (2014). "Virion attachment and entry: HIV gp120 Env biotinylation, gp120 Env, or integrin ligand-binding assay." Methods Mol Biol **1087**: 3-12.
- Clayton, A., J. Court, H. Navabi, M. Adams, M. D. Mason, J. A. Hobot, G. R. Newman and B. Jasani (2001). "Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry." J Immunol Methods **247**(1-2): 163-174.
- Cocca, B. A., A. M. Cline and M. Z. Radic (2002). "Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens." J Immunol **169**(1): 159-166.
- Cocucci, E., G. Racchetti and J. Meldolesi (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." Trends in cell biology **19**(2): 43-51.
- Colombo, E., B. Borgiani, C. Verderio and R. Furlan (2012). "Microvesicles: novel biomarkers for neurological disorders." Front Physiol **3**: 63.
- Crowell, T. A. and H. Hatano (2015). "Clinical outcomes and antiretroviral therapy in 'elite' controllers: a review of the literature." J Virus Erad **1**(2): 72-77.
- Dai, S., D. Wei, Z. Wu, X. Zhou, X. Wei, H. Huang and G. Li (2008). "Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer." Mol Ther **16**(4): 782-790.
- Danielson, K. M. and S. Das (2014). "Extracellular Vesicles in Heart Disease: Excitement for the Future ?" Exosomes Microvesicles **2**(1).

- Davis, D. M. (2007). "Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response." Nature Reviews Immunology **7**(3): 238-243.
- Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie and C. DePierres (2006). "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression." Nature **443**(7109): 350-354.
- Denzer, K., M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel and H. J. Geuze (2000). "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3365-3374.
- Dettenhofer, M. and X. F. Yu (1999). "Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions." J Virol **73**(2): 1460-1467.
- Di Vizio, D., J. Kim, M. H. Hager, M. Morello, W. Yang, C. J. Lafargue, L. D. True, M. A. Rubin, R. M. Adam, R. Beroukhim, F. Demichelis and M. R. Freeman (2009). "Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease." Cancer Res **69**(13): 5601-5609.
- Di Vizio, D., M. Morello, A. C. Dudley, P. W. Schow, R. M. Adam, S. Morley, D. Mulholland, M. Rotinen, M. H. Hager, L. Insabato, M. A. Moses, F. Demichelis, M. P. Lisanti, H. Wu, M. Klagsbrun, N. A. Bhowmick, M. A. Rubin, C. D'Souza-Schorey and M. R. Freeman (2012). "Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease." Am J Pathol **181**(5): 1573-1584.
- Dreyer, F. and A. Baur (2016). "Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles." Methods Mol Biol **1448**: 201-216.
- Dufour, E., R. El Dirani-Diab, F. Boulme, M. Fournier, G. Nevinsky, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak and M. L. Andreola (1998). "p66/p51 and p51/p51 recombinant forms of reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1--interactions with primer tRNA(Lys3), initiation of cDNA synthesis, and effect of inhibitors." Eur J Biochem **251**(1-2): 487-495.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, Jr. and R. M. Feather-Stone (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochem Pharmacol **7**: 88-95.
- Ellwanger, J. H., S. Crovella, E. C. dos Reis, A. Pontillo and J. A. B. Chies (2016). "Exosomes are possibly used as a tool of immune regulation during the dendritic cell-based immune therapy against HIV-1." Medical Hypotheses **95**: 67-70.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.
- Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie and H. J. Geuze (1998). "Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes." J Biol Chem **273**(32): 20121-20127.
- Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. Andre, M. P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboultaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J. B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin and L. Zitvogel (2005). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial." J Transl Med **3**(1): 10.
- Fais, S., L. O'Driscoll, F. E. Borrás, E. Buzas, G. Camussi, F. Cappello, J. Carvalho, A. Cordeiro da Silva, H. Del Portillo and S. El Andaloussi (2016). "Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine." ACS Nano **10**(4): 3886-3899.
- Fischer, S., K. Cornils, T. Speiseder, A. Badbaran, R. Reimer, D. Indenbirken, A. Grundhoff, B. Brunswig-Spickenheier, M. Alawi and C. Lange (2016). "Indication of Horizontal DNA Gene Transfer by Extracellular Vesicles." PLoS One **11**(9): e0163665.
- Gasser, O. and J. A. Schifferli (2004). "Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis." Blood **104**(8): 2543-2548.

- Gehrmann, U., K. R. Qazi, C. Johansson, K. Hultenby, M. Karlsson, L. Lundeberg, S. Gabrielsson and A. Scheynius (2011). "Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses—novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema." *PLoS One* **6**(7): e21480.
- Gonda, M. A., F. Wong-Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan and R. V. Gilden (1985). "Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus." *Science* **227**(4683): 173-177.
- Gould, S. J., J. E. Hildreth and A. M. Booth (2004). "The evolution of alloimmunity and the genesis of adaptive immunity." *Q Rev Biol* **79**(4): 359-382.
- Grasso, L., R. Wyss, L. Weidenauer, A. Thampi, D. Demurtas, M. Prudent, N. Lion and H. Vogel (2015). "Molecular screening of cancer-derived exosomes by surface plasmon resonance spectroscopy." *Anal Bioanal Chem* **407**(18): 5425-5432.
- Guescini, M., S. Genedani, V. Stocchi and L. F. Agnati (2010). "Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA." *J Neural Transm (Vienna)* **117**(1): 1-4.
- Gyorgy, B., K. Paloczi, A. Kovacs, E. Barabas, G. Beko, K. Varnai, E. Pallinger, K. Szabo-Taylor, T. G. Szabo, A. A. Kiss, A. Falus and E. I. Buzas (2014). "Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube." *Thromb Res* **133**(2): 285-292.
- Gyorgy, B., T. G. Szabo, M. Pasztoi, Z. Pal, P. Misjak, B. Aradi, V. Laszlo, E. Pallinger, E. Pap, A. Kittel, G. Nagy, A. Falus and E. I. Buzas (2011). "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles." *Cell Mol Life Sci* **68**(16): 2667-2688.
- Gyorgy, B., T. G. Szabo, L. Turiak, M. Wright, P. Herczeg, Z. Ledeczki, A. Kittel, A. Polgar, K. Toth, B. Derfalvi, G. Zelenak, I. Borocz, B. Carr, G. Nagy, K. Vekey, S. Gay, A. Falus and E. I. Buzas (2012). "Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases." *PLoS One* **7**(11): e49726.
- Hamlett, E. D., E. J. Goetzl, A. Ledreux, V. Vasilevko, H. A. Boger, A. LaRosa, D. Clark, S. L. Carroll, M. Carmona-Iragui, J. Fortea, E. J. Mufson, M. Sabbagh, A. H. Mohammed, D. Hartley, E. Doran, I. T. Lott and A. C. Granholm (2016). "Neuronal exosomes reveal Alzheimer's disease biomarkers in Down syndrome." *Alzheimers Dement*.
- Harding, C., J. Heuser and P. Stahl (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." *J Cell Biol* **97**(2): 329-339.
- Harding, C., J. Heuser and P. Stahl (1984). "Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding." *Eur J Cell Biol* **35**(2): 256-263.
- Hedlund, M., O. Nagaeva, D. Kargl, V. Baranov and L. Mincheva-Nilsson (2011). "Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells." *PLoS One* **6**(2): e16899.
- Heijnen, H. F., A. E. Schiel, R. Fijnheer, H. J. Geuze and J. J. Sixma (1999). "Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules." *Blood* **94**(11): 3791-3799.
- Hemler, M. E. (2003). "Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 397-422.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1982). "Mechanisms of intracellular protein breakdown." *Annu Rev Biochem* **51**: 335-364.
- Hess, C., S. Sadallah, A. Hefti, R. Landmann and J. A. Schifferli (1999). "Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units." *J Immunol* **163**(8): 4564-4573.

Hoffmann, M., N. Pantazis, G. E. Martin, S. Hickling, J. Hurst, J. Meyerowitz, C. B. Willberg, N. Robinson, H. Brown and M. Fisher (2016). "Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection." PLoS pathog **12**(7): e1005661.

Holme, P., N. Solum, F. Brosstad, M. Røger and M. Abdelnoor (1994). "Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting." Thrombosis and haemostasis **72**(5): 666-671.

Holmgren, L., A. Szeles, E. Rajnavolgyi, J. Folkman, G. Klein, I. Ernberg and K. I. Falk (1999). "Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies." Blood **93**(11): 3956-3963.

Hong, C. S., S. Funk, L. Muller, M. Boyiadzis and T. L. Whiteside (2016). "Isolation of biologically active and morphologically intact exosomes from plasma of patients with cancer." J Extracell Vesicles **5**: 29289.

Hood, J. L. (2016). "The Association of Exosomes with Lymph Nodes." Semin Cell Dev Biol.

Hosseini-Beheshti, E., S. Pham, H. Adomat, N. Li and E. S. Guns (2012). "Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes." Molecular & cellular proteomics: mcp. M111. 014845.

Hristov, M., W. Erl, S. Linder and P. C. Weber (2004). "Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro." Blood **104**(9): 2761-2766.

Huang, X., T. Yuan, M. Tschannen, Z. Sun, H. Jacob, M. Du, M. Liang, R. L. Dittmar, Y. Liu, M. Kohli, S. N. Thibodeau, L. Boardman and L. Wang (2013). "Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing." BMC Genomics **14**: 319.

Hubert, A., B. Barbeau, C. Subra, L. Bissonnette and C. Gilbert (2015). "Role and future applications of extracellular vesicles in HIV-1 pathogenesis." Future Virology **10**(4): 357-370.

Hubert, A., C. Subra, M. A. Jenabian, P. F. Tremblay Labrecque, C. Tremblay, B. Laffont, P. Provost, J. P. Routy and C. Gilbert (2015). "Elevated Abundance, Size, and MicroRNA Content of Plasma Extracellular Vesicles in Viremic HIV-1+ Patients: Correlations With Known Markers of Disease Progression." J Acquir Immune Defic Syndr **70**(3): 219-227.

Hunter, M. P., N. Ismail, X. Zhang, B. D. Aguda, E. J. Lee, L. Yu, T. Xiao, J. Schafer, M. L. Lee, T. D. Schmittgen, S. P. Nana-Sinkam, D. Jarjoura and C. B. Marsh (2008). "Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles." PLoS One **3**(11): e3694.

Im, H., H. Shao, Y. I. Park, V. M. Peterson, C. M. Castro, R. Weissleder and H. Lee (2014). "Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor." Nat Biotechnol **32**(5): 490-495.

Islam, A., H. Jones, T. Hiroi, J. Lam, J. Zhang, J. Moss, M. Vaughan and S. J. Levine (2008). "cAMP-dependent protein kinase A (PKA) signaling induces TNFR1 exosome-like vesicle release via anchoring of PKA regulatory subunit RIIbeta to BIG2." J Biol Chem **283**(37): 25364-25371.

Ismail, N., Y. Wang, D. Dakhallah, L. Moldovan, K. Agarwal, K. Batte, P. Shah, J. Wisler, T. D. Eubank, S. Tridandapani, M. E. Paulaitis, M. G. Piper and C. B. Marsh (2013). "Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer." Blood **121**(6): 984-995.

Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gomez, J. Archer, S. C. Hatch, I. Erkizia, J. Blanco, F. E. Borrás, M. C. Puertas, J. H. Connor, M. T. Fernandez-Figueras, L. Moore, B. Clotet, S. Gummuru and J. Martinez-Picado (2009). "Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway." Blood **113**(12): 2732-2741.

Jang, J. Y., J. K. Lee, Y. K. Jeon and C. W. Kim (2013). "Exosome derived from epigallocatechin gallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization." BMC Cancer **13**: 421.

Johnsen, K. B., J. M. Gudbergsson, M. N. Skov, L. Pilgaard, T. Moos and M. Duroux (2014). "A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles—endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer **1846**(1): 75-87.

Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr and C. Turbide (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-9420.

Kahlert, C., S. A. Melo, A. Protopopov, J. Tang, S. Seth, M. Koch, J. Zhang, J. Weitz, L. Chin and A. Futreal (2014). "Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer." Journal of Biological Chemistry **289**(7): 3869-3875.

Kalra, H., C. G. Adda, M. Liem, C. S. Ang, A. Mechler, R. J. Simpson, M. D. Hulett and S. Mathivanan (2013). "Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma." Proteomics **13**(22): 3354-3364.

Keerthikumar, S., L. Gangoda, M. Liem, P. Fonseka, I. Atukorala, C. Ozcitti, A. Mechler, C. G. Adda, C. S. Ang and S. Mathivanan (2015). "Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes." Oncotarget **6**(17): 15375-15396.

Keller, S., C. Rupp, A. Stoeck, S. Runz, M. Fogel, S. Lugert, H. Hager, M. Abdel-Bakky, P. Gutwein and P. Altevogt (2007). "CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid." Kidney international **72**(9): 1095-1102.

Khatua, A. K., H. E. Taylor, J. E. Hildreth and W. Popik (2009). "Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells." J Virol **83**(2): 512-521.

Kim, G., C. E. Yoo, M. Kim, H. J. Kang, D. Park, M. Lee and N. Huh (2012). "Noble polymeric surface conjugated with zwitterionic moieties and antibodies for the isolation of exosomes from human serum." Bioconjug Chem **23**(10): 2114-2120.

Kim, S.-H., E. R. Lechman, N. Bianco, R. Menon, A. Keravala, J. Nash, Z. Mi, S. C. Watkins, A. Gambotto and P. D. Robbins (2005). "Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis." The Journal of Immunology **174**(10): 6440-6448.

Kimpton, C., G. Corbitt and D. Morris (1990). "Comparison of polyethylene glycol precipitation and ultracentrifugation for recovery of cytomegalovirus from urine prior to detection of DNA by dot-blot hybridisation." Journal of virological methods **28**(2): 141-145.

Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M. T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J. C. Gluckman, J. C. Chermann and et al. (1984). "Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes." Science **225**(4657): 59-63.

Kleijmeer, M. J., J. M. Escola, F. G. UytdeHaag, E. Jakobson, J. M. Griffith, A. D. Osterhaus, W. Stoorvogel, C. J. Melief, C. Rabouille and H. J. Geuze (2001). "Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract." Traffic **2**(2): 124-137.

Konadu, K. A., J. Chu, M. B. Huang, P. K. Amancha, W. Armstrong, M. D. Powell, F. Villinger and V. C. Bond (2015). "Association of Cytokines With Exosomes in the Plasma of HIV-1-Seropositive Individuals." J Infect Dis **211**(11): 1712-1716.

Konadu, K. A., M. B. Huang, W. Roth, W. Armstrong, M. Powell, F. Villinger and V. Bond (2016). "Isolation of Exosomes from the Plasma of HIV-1 Positive Individuals." J Vis Exp(107).

Kordelas, L., V. Rebmann, A. Ludwig, S. Radtke, J. Ruesing, T. Doepfner, M. Epple, P. Horn, D. Beelen and B. Giebel (2014). "MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease." Leukemia **28**(4): 970.

- Kotler, D. P., S. Reka, A. Borcich and W. J. Cronin (1991). "Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV." Am J Pathol **139**(4): 823-830.
- Kowal, J., G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J. P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach and C. Thery (2016). "Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(8): E968-977.
- Kramer, B., A. Pelchen-Matthews, M. Deneka, E. Garcia, V. Piguet and M. Marsh (2005). "HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 136-142.
- Kumar, D., D. Gupta, S. Shankar and R. K. Srivastava (2015). "Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer." Oncotarget **6**(5): 3280-3291.
- Lamparski, H. G., A. Metha-Damani, J. Y. Yao, S. Patel, D. H. Hsu, C. Ruegg and J. B. Le Pecq (2002). "Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells." J Immunol Methods **270**(2): 211-226.
- Lasser, C., V. S. Alikhani, K. Ekstrom, M. Eldh, P. T. Paredes, A. Bossios, M. Sjostrand, S. Gabrielsson, J. Lotvall and H. Valadi (2011). "Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages." J Transl Med **9**: 9.
- Lasser, C., S. E. O'Neil, L. Ekerljung, K. Ekstrom, M. Sjostrand and J. Lotvall (2011). "RNA-containing exosomes in human nasal secretions." Am J Rhinol Allergy **25**(2): 89-93.
- Laulagnier, K., C. Motta, S. Hamdi, S. Roy, F. Fauvelle, J. F. Pageaux, T. Kobayashi, J. P. Salles, B. Perret, C. Bonnerot and M. Record (2004). "Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization." Biochem J **380**(Pt 1): 161-171.
- Lee, C., R. P. Carney, S. Hazari, Z. J. Smith, A. Knudson, C. S. Robertson, K. S. Lam and S. Wachsmann-Hogiu (2015). "3D plasmonic nanobowl platform for the study of exosomes in solution." Nanoscale **7**(20): 9290-9297.
- Lenassi, M., G. Cagney, M. Liao, T. Vaupotic, K. Bartholomeeusen, Y. Cheng, N. J. Krogan, A. Plemenitas and B. M. Peterlin (2010). "HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells." Traffic **11**(1): 110-122.
- Lener, T., M. Gimona, L. Aigner, V. Borger, E. Buzas, G. Camussi, N. Chaput, D. Chatterjee, F. A. Court, H. A. Del Portillo, L. O'Driscoll, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, U. Felderhoff-Mueser, L. Fraile, Y. S. Gho, A. Gorgens, R. C. Gupta, A. Hendrix, D. M. Hermann, A. F. Hill, F. Hochberg, P. A. Horn, D. de Kleijn, L. Kordelas, B. W. Kramer, E. M. Kramer-Albers, S. Laner-Plamberger, S. Laitinen, T. Leonardi, M. J. Lorenowicz, S. K. Lim, J. Lotvall, C. A. Maguire, A. Marcilla, I. Nazarenko, T. Ochiya, T. Patel, S. Pedersen, G. Pocsfalvi, S. Pluchino, P. Quesenberry, I. G. Reischl, F. J. Rivera, R. Sanzenbacher, K. Schallmoser, I. Slaper-Cortenbach, D. Strunk, T. Tonn, P. Vader, B. W. van Balkom, M. Wauben, S. E. Andaloussi, C. Thery, E. Rohde and B. Giebel (2015). "Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper." J Extracell Vesicles **4**: 30087.
- Li, J., K. Liu, Y. Liu, Y. Xu, F. Zhang, H. Yang, J. Liu, T. Pan, J. Chen and M. Wu (2013). "Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- α -induced antiviral activity." Nature immunology **14**(8): 793-803.
- Liang, Y., W. S. Eng, D. R. Colquhoun, R. R. Dinglasan, D. R. Graham and L. K. Mahal (2014). "Complex N-linked glycans serve as a determinant for exosome/microvesicle cargo recruitment." J Biol Chem **289**(47): 32526-32537.
- Linares, R., S. Tan, C. Gounou, N. Arraud and A. R. Brisson (2015). "High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles." J Extracell Vesicles **4**: 29509.

- Llorente, A., T. Skotland, T. Sylvanne, D. Kauhanen, T. Rog, A. Orlowski, I. Vattulainen, K. Ekroos and K. Sandvig (2013). "Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells." Biochim Biophys Acta **1831**(7): 1302-1309.
- Lobb, R. J., M. Becker, S. W. Wen, C. S. Wong, A. P. Wiegman, A. Leimgruber and A. Moller (2015). "Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma." J Extracell Vesicles **4**: 27031.
- Looze, C., D. Yui, L. Leung, M. Ingham, M. Kaler, X. Yao, W. W. Wu, R. F. Shen, M. P. Daniels and S. J. Levine (2009). "Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein." Biochem Biophys Res Commun **378**(3): 433-438.
- Lorenzo-Redondo, R., H. R. Fryer, T. Bedford, E. Y. Kim, J. Archer, S. L. Kosakovsky Pond, Y. S. Chung, S. Penugonda, J. G. Chipman, C. V. Fletcher, T. W. Schacker, M. H. Malim, A. Rambaut, A. T. Haase, A. R. McLean and S. M. Wolinsky (2016). "Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy." Nature **530**(7588): 51-56.
- Lötvall, J., A. F. Hill, F. Hochberg, E. I. Buzás, D. Di Vizio, C. Gardiner, Y. S. Gho, I. V. Kurochkin, S. Mathivanan and P. Quesenberry (2014). "Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles." Journal of extracellular vesicles **3**.
- Mack, M., A. Kleinschmidt, H. Bruhl, C. Klier, P. J. Nelson, J. Cihak, J. Plachy, M. Stangassinger, V. Erfle and D. Schlöndorff (2000). "Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection." Nat Med **6**(7): 769-775.
- Madison, M. N. and C. M. Okeoma (2015). "Exosomes: Implications in HIV-1 Pathogenesis." Viruses **7**(7): 4093-4118.
- Madison, M. N., R. J. Roller and C. M. Okeoma (2014). "Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity." Retrovirology **11**: 102.
- Maiolo, D., L. Paolini, G. Di Noto, A. Zendrini, D. Berti, P. Bergese and D. Ricotta (2015). "Colorimetric nanoplasmonic assay to determine purity and titrate extracellular vesicles." Anal Chem **87**(8): 4168-4176.
- Mathivanan, S., C. J. Fahner, G. E. Reid and R. J. Simpson (2012). "ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D1241-1244.
- Matsumoto, Y., M. Kano, Y. Akutsu, N. Hanari, I. Hoshino, K. Murakami, A. Usui, H. Suito, M. Takahashi, R. Otsuka, H. Xin, A. Komatsu, K. Iida and H. Matsubara (2016). "Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma." Oncol Rep **36**(5): 2535-2543.
- McCune, J. M. (2001). "The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease." Nature **410**(6831): 974-979.
- Menck, K., C. Scharf, A. Bleckmann, L. Dyck, U. Rost, D. Wenzel, V. M. Dhople, L. Siam, T. Pukrop, C. Binder and F. Klemm (2015). "Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN." J Mol Cell Biol **7**(2): 143-153.
- Mfunyi, C. M., M. Vaillancourt, J. Vitry, T. R. Nsimba Batomene, A. Posvanzic, A. A. Lambert and C. Gilbert (2015). "Exosome release following activation of the dendritic cell immunoreceptor: a potential role in HIV-1 pathogenesis." Virology **484**: 103-112.
- Michael, A., S. D. Bajracharya, P. S. Yuen, H. Zhou, R. A. Star, G. G. Illei and I. Alevizos (2010). "Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers." Oral diseases **16**(1): 34-38.
- Minciacchi, V. R., S. You, C. Spinelli, S. Morley, M. Zandian, P. J. Aspuria, L. Cavallini, C. Ciardiello, M. Reis Sobreiro, M. Morello, G. Kharmate, S. C. Jang, D. K. Kim, E. Hosseini-Beheshti, E. Tomlinson Guns, M. Gleave, Y. S. Gho, S. Mathivanan, W. Yang, M. R. Freeman and D. Di Vizio (2015). "Large oncosomes

contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles." Oncotarget **6**(13): 11327-11341.

Momen-Heravi, F., L. Balaj, S. Alian, A. J. Trachtenberg, F. H. Hochberg, J. Skog and W. P. Kuo (2012). "Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles." Front Physiol **3**: 162.

Monleón, I., M. J. Martinez-Lorenzo, L. Monteagudo, P. Lasierra, M. Taulés, M. Iturralde, A. Piñeiro, L. Larrad, M. A. Alava and J. Naval (2001). "Differential secretion of Fas ligand-or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells." The Journal of Immunology **167**(12): 6736-6744.

Montecalvo, A., W. J. Shufesky, D. B. Stolz, M. G. Sullivan, Z. Wang, S. J. Divito, G. D. Papworth, S. C. Watkins, P. D. Robbins and A. T. Larregina (2008). "Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition." The Journal of Immunology **180**(5): 3081-3090.

Morse, M. A., J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T. M. Clay, N. Valente, R. Shreeniwas, M. A. Sutton, A. Delcayre, D. H. Hsu, J. B. Le Pecq and H. K. Lyerly (2005). "A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer." J Transl Med **3**(1): 9.

Muhsin-Sharafaldine, M. R., S. C. Saunderson, A. C. Dunn, J. M. Faed, T. Kleffmann and A. D. McLellan (2016). "Procoagulant and immunogenic properties of melanoma exosomes, microvesicles and apoptotic vesicles." Oncotarget.

Müller, G. (2012). "Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases." Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy **5**: 247.

Muller, L., C.-S. Hong, D. B. Stolz, S. C. Watkins and T. L. Whiteside (2014). "Isolation of biologically-active exosomes from human plasma." Journal of immunological methods **411**: 55-65.

Muller, L., C. S. Hong, D. B. Stolz, S. C. Watkins and T. L. Whiteside (2014). "Isolation of biologically-active exosomes from human plasma." J Immunol Methods **411**: 55-65.

Muntasell, A., A. C. Berger and P. A. Roche (2007). "T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes." The EMBO journal **26**(19): 4263-4272.

Narayanan, A., S. Iordanskiy, R. Das, R. Van Duyne, S. Santos, E. Jaworski, I. Guendel, G. Sampey, E. Dalby, M. Iglesias-Ussel, A. Popratiloff, R. Hakami, K. Kehn-Hall, M. Young, C. Subra, C. Gilbert, C. Bailey, F. Romerio and F. Kashanchi (2013). "Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA." J Biol Chem **288**(27): 20014-20033.

Natasha, G., B. Gundogan, A. Tan, Y. Farhatnia, W. Wu, J. Rajadas and A. M. Seifalian (2014). "Exosomes as immunotheranostic nanoparticles." Clinical therapeutics **36**(6): 820-829.

Nguyen, D. G., A. Booth, S. J. Gould and J. E. Hildreth (2003). "Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway." Journal of Biological Chemistry **278**(52): 52347-52354.

Nolte-t Hoen, E. N., H. P. Buermans, M. Waasdorp, W. Stoorvogel, M. H. Wauben and P. A. t Hoen (2012). "Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions." Nucleic Acids Res **40**(18): 9272-9285.

Nolte-t Hoen, E. N., S. I. Buschow, S. M. Anderton, W. Stoorvogel and M. H. Wauben (2009). "Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1." Blood **113**(9): 1977-1981.

Nolte-t Hoen, E. N. and M. H. Wauben (2012). "Immune cell-derived vesicles: modulators and mediators of inflammation." Curr Pharm Des **18**(16): 2357-2368.

- Nordin, J. Z., Y. Lee, P. Vader, I. Mager, H. J. Johansson, W. Heusermann, O. P. Wiklander, M. Hallbrink, Y. Seow, J. J. Bultema, J. Gilthorpe, T. Davies, P. J. Fairchild, S. Gabrielsson, N. C. Meisner-Kober, J. Lehtio, C. I. Smith, M. J. Wood and S. El Andaloussi (2015). "Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties." Nanomedicine **11**(4): 879-883.
- Okoye, I. S., S. M. Coomes, V. S. Pelly, S. Czieso, V. Papayannopoulos, T. Tolmachova, M. C. Seabra and M. S. Wilson (2014). "MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells." Immunity **41**(1): 89-103.
- Okulicz, J. F. and O. Lambotte (2011). "Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers." Curr Opin HIV AIDS **6**(3): 163-168.
- Palanisamy, V., S. Sharma, A. Deshpande, H. Zhou, J. Gimzewski and D. T. Wong (2010). "Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes." PLoS One **5**(1): e8577.
- Palmisano, G., S. S. Jensen, M.-C. Le Bihan, J. Lainé, J. N. McGuire, F. Pociot and M. R. Larsen (2012). "Characterization of membrane-shed microvesicles from cytokine-stimulated β -cells using proteomics strategies." Molecular & cellular proteomics **11**(8): 230-243.
- Pan, B. T. and R. Johnstone (1984). "Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis." J Biol Chem **259**(15): 9776-9782.
- Pan, B. T., K. Teng, C. Wu, M. Adam and R. M. Johnstone (1985). "Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes." J Cell Biol **101**(3): 942-948.
- Parolini, I., C. Federici, C. Raggi, L. Lugini, S. Palleschi, A. De Milito, C. Coscia, E. Iessi, M. Logozzi and A. Molinari (2009). "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells." Journal of Biological Chemistry **284**(49): 34211-34222.
- Peche, H., M. Heslan, C. Usal, S. Amigorena and M. C. Cuturi (2003). "Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection." Transplantation **76**(10): 1503-1510.
- Pelchen-Matthews, A., G. Raposo and M. Marsh (2004). "Endosomes, exosomes and Trojan viruses." Trends Microbiol **12**(7): 310-316.
- Peters, P. J., H. J. Geuze, H. A. Van der Donk, J. W. Slot, J. M. Griffith, N. J. Stam, H. C. Clevers and J. Borst (1989). "Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes." Eur J Immunol **19**(8): 1469-1475.
- Pisitkun, T., R.-F. Shen and M. A. Knepper (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(36): 13368-13373.
- Pitt, J. M., F. Andre, S. Amigorena, J. C. Soria, A. Eggermont, G. Kroemer and L. Zitvogel (2016). "Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy." J Clin Invest **126**(4): 1224-1232.
- Pitt, J. M., M. Charrier, S. Viaud, F. André, B. Besse, N. Chaput and L. Zitvogel (2014). "Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer." The Journal of Immunology **193**(3): 1006-1011.
- Poliakov, A., M. Spilman, T. Dokland, C. L. Amling and J. A. Mobley (2009). "Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen." Prostate **69**(2): 159-167.
- Properzi, F., M. Logozzi and S. Fais (2013). "Exosomes: the future of biomarkers in medicine." Biomark Med **7**(5): 769-778.
- Qazi, K. R., U. Gehrmann, E. D. Jordö, M. C. Karlsson and S. Gabrielsson (2009). "Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B cell-dependent mechanism." Blood **113**(12): 2673-2683.

- Rabesandratana, H., J. P. Toutant, H. Reggio and M. Vidal (1998). "Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during In vitro maturation of reticulocytes." Blood **91**(7): 2573-2580.
- Rabinowits, G., C. Gercel-Taylor, J. M. Day, D. D. Taylor and G. H. Kloecker (2009). "Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer." Clin Lung Cancer **10**(1): 42-46.
- Rahbari, M., N. Rahbari, C. Reissfelder, J. Weitz and C. Kahlert (2016). "Exosomes: novel implications in diagnosis and treatment of gastrointestinal cancer." Langenbeck's Archives of Surgery: 1-14.
- Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief and H. J. Geuze (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J Exp Med **183**(3): 1161-1172.
- Raposo, G. and W. Stoorvogel (2013). "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." J Cell Biol **200**(4): 373-383.
- Raposo, G., D. Tenza, S. Mecheri, R. Peronet, C. Bonnerot and C. Desaymard (1997). "Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation." Mol Biol Cell **8**(12): 2631-2645.
- Ratajczak, J., M. Wysoczynski, F. Hayek, A. Janowska-Wieczorek and M. Z. Ratajczak (2006). "Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication." Leukemia **20**(9): 1487-1495.
- Rialland, P., D. Lankar, G. Raposo, C. Bonnerot and P. Hubert (2006). "BCR-bound antigen is targeted to exosomes in human follicular lymphoma B-cells1." Biology of the Cell **98**(8): 491-501.
- Ridder, K., S. Keller, M. Dams, A.-K. Rupp, J. Schlaudraff, D. Del Turco, J. Starmann, J. Macas, D. Karpova and K. Devraj (2014). "Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation." PLoS Biol **12**(6): e1001874.
- Rivera, J., R. J. Cordero, A. S. Nakouzi, S. Frases, A. Nicola and A. Casadevall (2010). "Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(44): 19002-19007.
- Royo, F., P. Zuniga-Garcia, P. Sanchez-Mosquera, A. Egia, A. Perez, A. Loizaga, R. Arceo, I. Lacasa, A. Rabade, E. Arrieta, R. Bilbao, M. Unda, A. Carracedo and J. M. Falcon-Perez (2016). "Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples." J Extracell Vesicles **5**: 29497.
- Rozmyslowicz, T., M. Majka, J. Kijowski, S. L. Murphy, D. O. Conover, M. Poncz, J. Ratajczak, G. N. Gaulton and M. Z. Ratajczak (2003). "Platelet-and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV." AIDS **17**(1): 33-42.
- Rubin, O., D. Crettaz, J. D. Tissot and N. Lion (2010). "Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics." Talanta **82**(1): 1-8.
- Saez, F., G. Frenette and R. Sullivan (2003). "Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells." Journal of Andrology **24**(2): 149-154.
- Sahlen, G., O. Nilsson, A. Larsson, L. Carlsson, B. J. Norlen and G. Ronquist (2010). "Secretions from seminal vesicles lack characteristic markers for prostasomes." Ups J Med Sci **115**(2): 107-112.
- Sainz, T., S. Serrano-Villar, L. Díaz, M. I. G. Tomé, M. D. Gurbindo, M. I. de José, M. J. Mellado, J. T. Ramos, J. Zamora and S. Moreno (2013). "The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults." AIDS **27**(9): 1513-1516.

Saman, S., W. Kim, M. Raya, Y. Visnick, S. Miro, S. Saman, B. Jackson, A. C. McKee, V. E. Alvarez and N. C. Lee (2012). "Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease." Journal of Biological Chemistry **287**(6): 3842-3849.

Saunderson, S. C., A. C. Dunn, P. R. Crocker and A. D. McLellan (2014). "CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node." Blood **123**(2): 208-216.

Saunderson, S. C., P. C. Schuberth, A. C. Dunn, L. Miller, B. D. Hock, P. A. MacKay, N. Koch, R. W. Jack and A. D. McLellan (2008). "Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor." J Immunol **180**(12): 8146-8152.

Savina, A., M. Vidal and M. I. Colombo (2002). "The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11." Journal of cell science **115**(12): 2505-2515.

Scarlata, S. and C. Carter (2003). "Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly." Biochim Biophys Acta **1614**(1): 62-72.

Schmidt, O. and D. Teis (2012). "The ESCRT machinery." Curr Biol **22**(4): R116-120.

Segura, E., C. Guérin, N. Hogg, S. Amigorena and C. Théry (2007). "CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo." The Journal of Immunology **179**(3): 1489-1496.

Segura, E., C. Nicco, B. Lombard, P. Véron, G. Raposo, F. Batteux, S. Amigorena and C. Théry (2005). "ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming." Blood **106**(1): 216-223.

Serrano-Villar, S. and S. G. Deeks (2015). "CD4/CD8 ratio: an emerging biomarker for HIV." Lancet HIV **2**(3): e76-77.

Shen, Y., J. Kim, E. F. Strittmatter, J. M. Jacobs, D. G. Camp, R. Fang, N. Tolié, R. J. Moore and R. D. Smith (2005). "Characterization of the human blood plasma proteome." Proteomics **5**(15): 4034-4045.

Shimoda, M. and R. Khokha (2013). "Proteolytic factors in exosomes." Proteomics **13**(10-11): 1624-1636.

Shimoda, M., S. Principe, H. W. Jackson, V. Luga, H. Fang, S. D. Molyneux, Y. W. Shao, A. Aiken, P. D. Waterhouse and C. Karamboulas (2014). "Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state." Nature cell biology **16**(9): 889-901.

Silverman, J. M. and N. E. Reiner (2011). "Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes." Cellular microbiology **13**(1): 1-9.

Skoczek, M., M. Nosek and P. Weroński (2016). "Voltammetric monitoring of prostatesome aggregation and self-fusion." Electrochimica Acta **190**: 1078-1086.

Skog, J., T. Würdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, W. T. Curry, B. S. Carter, A. M. Krichevsky and X. O. Breakefield (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." Nature cell biology **10**(12): 1470-1476.

Smalley, D. M., N. E. Sheman, K. Nelson and D. Theodorescu (2008). "Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer." Journal of proteome research **7**(5): 2088-2096.

Smith, J. A. and R. Daniel (2016). "Human vaginal fluid contains exosomes that have an inhibitory effect on an early step of the HIV-1 life cycle." AIDS **30**(17): 2611-2616.

Sonigo, P., M. Alizon, K. Staskus, D. Klatzmann, S. Cole, O. Danos, E. Retzel, P. Tiollais, A. Haase and S. Wain-Hobson (1985). "Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus." Cell **42**(1): 369-382.

Stinchcombe, J., G. Bossi and G. M. Griffiths (2004). "Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes." Science **305**(5680): 55-59.

- Street, J. M., P. E. Barran, C. L. Mackay, S. Weidt, C. Balmforth, T. S. Walsh, R. T. Chalmers, D. J. Webb and J. W. Dear (2012). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid." J Transl Med **10**: 5.
- Stremersch, S., S. C. De Smedt and K. Raemdonck (2016). "Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles." J Control Release.
- Subra, C. (2013). "Dendritic Cells Pulsed with HIV-1 Release Exosomes that Promote Apoptosis in Cd4+ T Lymphocytes." Journal of Clinical & Cellular Immunology **04**(01).
- Subra, C., K. Laulagnier, B. Perret and M. Record (2007). "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies." Biochimie **89**(2): 205-212.
- Svennerholm, K., P. Rodsand, U. Hellman, A. Waldenstrom, M. Lundholm, D. Ahren, B. Biber, G. Ronquist and M. Haney (2016). "DNA Content in Extracellular Vesicles Isolated from Porcine Coronary Venous Blood Directly after Myocardial Ischemic Preconditioning." PLoS One **11**(7): e0159105.
- Tan, A., J. Rajadas and A. M. Seifalian (2013). "Exosomes as nano-theranostic delivery platforms for gene therapy." Advanced drug delivery reviews **65**(3): 357-367.
- Tanaka, K. (1985). "[Mechanisms of intracellular protein breakdown--distinct role of lysosomal and nonlysosomal route]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **30**(6): 441-459.
- Tauro, B. J., D. W. Greening, R. A. Mathias, H. Ji, S. Mathivanan, A. M. Scott and R. J. Simpson (2012). "Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes." Methods **56**(2): 293-304.
- Taverna, S., A. Flugy, L. Saieva, E. C. Kohn, A. Santoro, S. Meraviglia, G. De Leo and R. Alessandro (2012). "Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis." Int J Cancer **130**(9): 2033-2043.
- Taverna, S., M. Giallombardo, I. Gil-Bazo, A. P. Carreca, M. Castiglia, J. Chacártegui, A. Araujo, R. Alessandro, P. Pauwels and M. Peeters (2016). "Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patients: critical analysis of evidence and potential role in clinical practice." Oncotarget **7**(19): 28748-28760.
- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." Gynecologic oncology **110**(1): 13-21.
- Teow, S. Y., A. C. Nordin, S. A. Ali and A. S. Khoo (2016). "Exosomes in Human Immunodeficiency Virus Type I Pathogenesis: Threat or Opportunity?" Adv Virol **2016**: 9852494.
- Thakur, B. K., H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, Y. Zheng, A. Hoshino, H. Brazier, J. Xiang, C. Williams, R. Rodriguez-Barrueco, J. M. Silva, W. Zhang, S. Hearn, O. Elemento, N. Paknejad, K. Manova-Todorova, K. Welte, J. Bromberg, H. Peinado and D. Lyden (2014). "Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection." Cell Res **24**(6): 766-769.
- Thery, C., S. Amigorena, G. Raposo and A. Clayton (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 22.
- Thery, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin and S. Amigorena (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." J Immunol **166**(12): 7309-7318.
- Thery, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz and S. Amigorena (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." Nat Immunol **3**(12): 1156-1162.
- Thery, C., M. Ostrowski and E. Segura (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." Nat Rev Immunol **9**(8): 581-593.

- Théry, C., M. Ostrowski and E. Segura (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." Nature Reviews Immunology **9**(8): 581-593.
- Théry, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J Cell Biol **147**(3): 599-610.
- Thind, A. and C. Wilson (2016). "Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets." Journal of extracellular vesicles **5**.
- Tokuhiya, M., Y. Ichikawa, N. Kosaka, T. Ochiya, M. Yashiro, K. Hirakawa, T. Kosaka, H. Makino, H. Akiyama and C. Kunisaki (2015). "Exosomal miRNAs from peritoneum lavage fluid as potential prognostic biomarkers of peritoneal metastasis in gastric cancer." PLoS One **10**(7): e0130472.
- Trams, E. G., C. J. Lauter, N. Salem, Jr. and U. Heine (1981). "Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles." Biochim Biophys Acta **645**(1): 63-70.
- Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad and R. P. Sekaly (2006). "Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction." Nat Med **12**(10): 1198-1202.
- Tumne, A., V. S. Prasad, Y. Chen, D. B. Stolz, K. Saha, D. M. Ratner, M. Ding, S. C. Watkins and P. Gupta (2009). "Noncytotoxic suppression of human immunodeficiency virus type 1 transcription by exosomes secreted from CD8+ T cells." J Virol **83**(9): 4354-4364.
- Valadi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee and J. O. Lötvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nature cell biology **9**(6): 654-659.
- Van Deun, J., P. Mestdagh, R. Sormunen, V. Cocquyt, K. Vermaelen, J. Vandesompele, M. Bracke, O. De Wever and A. Hendrix (2014). "The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling." J Extracell Vesicles **3**.
- van Niel, G., I. Porto-Carreiro, S. Simoes and G. Raposo (2006). "Exosomes: a common pathway for a specialized function." J Biochem **140**(1): 13-21.
- van Niel, G., G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan and M. Heyman (2001). "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles." Gastroenterology **121**(2): 337-349.
- Wahlgren, J., T. D. L. Karlson, P. Glader, E. Telemo and H. Valadi (2012). "Activated human T cells secrete exosomes that participate in IL-2 mediated immune response signaling." PLoS One **7**(11): e49723.
- Wang, J. J., R. Horton, V. Varthakavi, P. Spearman and L. Ratner (1999). "Formation and release of virus-like particles by HIV-1 matrix protein." AIDS **13**(2): 281-283.
- Wang, W., H. Li, Y. Zhou and S. Jie (2013). "Peripheral blood microvesicles are potential biomarkers for hepatocellular carcinoma." Cancer Biomark **13**(5): 351-357.
- Watts, J. M., K. K. Dang, R. J. Gorelick, C. W. Leonard, J. W. Bess, Jr., R. Swanstrom, C. L. Burch and K. M. Weeks (2009). "Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome." Nature **460**(7256): 711-716.
- Weber, J. A., D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. H. Huang, M. J. Lee, D. J. Galas and K. Wang (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem **56**(11): 1733-1741.
- Welch, J. L., M. N. Madison, J. B. Margolick, S. Galvin, P. Gupta, O. Martinez-Maza, C. Dash and C. M. Okeoma (2017). "Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity." Sci Rep **7**: 45034.

- Welton, J. L., J. P. Webber, L. A. Botos, M. Jones and A. Clayton (2015). "Ready-made chromatography columns for extracellular vesicle isolation from plasma." J Extracell Vesicles **4**: 27269.
- Witek, R. P., L. Yang, R. Liu, Y. Jung, A. Omenetti, W. K. Syn, S. S. Choi, Y. Cheong, C. M. Fearing, K. M. Agboola, W. Chen and A. M. Diehl (2009). "Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells." Gastroenterology **136**(1): 320-330 e322.
- Witwer, K. W., E. I. Buzas, L. T. Bemis, A. Bora, C. Lasser, J. Lotvall, E. N. Nolte-'t Hoen, M. G. Piper, S. Sivaraman, J. Skog, C. Thery, M. H. Wauben and F. Hochberg (2013). "Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research." J Extracell Vesicles **2**.
- Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena and L. Zitvogel (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." Nat Med **7**(3): 297-303.
- Wubbolts, R., R. S. Leckie, P. T. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Mobius, J. Hoernschemeyer, J. W. Slot, H. J. Geuze and W. Stoorvogel (2003). "Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation." J Biol Chem **278**(13): 10963-10972.
- Wurdinger, T., N. N. Gatson, L. Balaj, B. Kaur, X. O. Breakefield and D. M. Pegtel (2012). "Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways." Advances in virology **2012**.
- Xie, Y., H. Zhang, W. Li, Y. Deng, M. A. Munegowda, R. Chibbar, M. Qureshi and J. Xiang (2010). "Dendritic cells recruit T cell exosomes via exosomal LFA-1 leading to inhibition of CD8+ CTL responses through downregulation of peptide/MHC class I and Fas ligand-mediated cytotoxicity." The Journal of Immunology **185**(9): 5268-5278.
- Yáñez-Mó, M., P. R.-M. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borràs, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello and J. Carvalho (2015). "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions." Journal of extracellular vesicles **4**.
- Yanez-Mo, M., P. R. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borràs, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colas, A. Cordeiro-da Silva, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, I. M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N. H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E. M. Kramer-Albers, S. Laitinen, C. Lasser, T. Lener, E. Ligeti, A. Line, G. Lipps, A. Llorente, J. Lotvall, M. Mancek-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E. N. Nolte-'t Hoen, T. A. Nyman, L. O'Driscoll, M. Oliván, C. Oliveira, E. Pallinger, H. A. Del Portillo, J. Reventos, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sanchez-Madrid, N. Santarem, K. Schallmoser, M. S. Ostenfeld, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S. G. Van der Grein, M. H. Vasconcelos, M. H. Wauben and O. De Wever (2015). "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions." J Extracell Vesicles **4**: 27066.
- Yang, C., S. H. Kim, N. R. Bianco and P. D. Robbins (2011). "Tumor-derived exosomes confer antigen-specific immunosuppression in a murine delayed-type hypersensitivity model." PLoS One **6**(8): e22517.
- Yoo, C. E., G. Kim, M. Kim, D. Park, H. J. Kang, M. Lee and N. Huh (2012). "A direct extraction method for microRNAs from exosomes captured by immunoaffinity beads." Anal Biochem **431**(2): 96-98.
- Yu, X., C. Huang, B. Song, Y. Xiao, M. Fang, J. Feng and P. Wang (2013). "CD4+ CD25+ regulatory T cells-derived exosomes prolonged kidney allograft survival in a rat model." Cellular immunology **285**(1): 62-68.
- Zijlstra, C. and W. Stoorvogel (2016). "Prostasomes as a source of diagnostic biomarkers for prostate cancer." Journal of Clinical Investigation **126**(4): 1144.
- Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.

Zoller, M. (2009). "Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis." Nat Rev Cancer **9**(1): 40-55.

Zonneveld, M. I., A. R. Brisson, M. J. van Herwijnen, S. Tan, C. H. van de Lest, F. A. Redegeld, J. Garssen, M. H. Wauben and E. N. Nolte (2014). "Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures." Journal of extracellular vesicles **3**.