



Institut national
de la recherche
scientifique

Université du Québec
Institut National de la Recherche scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Laval, Québec

**ISOLATION ET CARACTÉRISATION DES VÉSICULES
EXTRACELLULAIRES PÉRIPHÉRIQUES ET ANALYSE IN VITRO ET IN
VIVO DE LEURS PERMÉABILITÉS À TRAVERS LA BARRIÈRE
HÉMATOENCÉPHALIQUE**

Par
Sarra Landri

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maîtrise sciences (M.Sc.) en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr Bukong, Terence Ndonyi
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Pr Benoit Barbeau
Département des sciences biologiques
Université de Québec à Montréal

Directeur de recherche

Pr Charles Ramassamy
INRS- Institut Armand Frappier

« Il n'y a qu'une façon d'échouer, c'est d'abandonner avant d'avoir réussi. »

George Clemenceau

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au professeur Charles Ramassamy, mon directeur de recherche au centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, qui m'a encadré tout au long de cette maîtrise et qui m'a fourni son soutien et son appui professionnel.

Un remerciement particulier à Mohamed Haddad, Jean-Michel et Raâfet Ben-Kheder, pour leur patience, leur disponibilité et leur professionnalisme.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire Charles Ramassamy, Vincent Hervé, Morgane Perrot, Morgane Lambert, pour leurs accueils, leurs conseils, et tous ces bons moments passés ensemble.

À mon mari Said Baraoui, pour son amour, sa noblesse, ces conseils et sa patience tout le long de ma maîtrise.

Finalement, je voudrais remercier ma famille de m'avoir aidé et encouragé à distance. Ils seront toujours ma source d'inspiration et de motivation, et leurs soutiens inébranlables me touchent énormément.

Merci à vous tous!

Je profite également de l'occasion pour remercier les évaluateurs de mon mémoire " Pr Bukong Terence Ndongi ; Pr Benoît Barbeau et Pr Charles Ramassamy" pour leurs temps et leurs contributions à la finalisation de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
RÉSUMÉ	X
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
CHAPITRE 1 : LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES	1
1.1 DEFINITION :	1
1.2 LES DIFFÉRENTES POPULATIONS DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES :	2
1.2.1 <i>Les microvésicules (MVs)</i>	2
1.2.2 <i>Les corps apoptotiques</i>	3
1.2.3 <i>Les exosomes</i>	3
CHAPITRE 2 : MÉTHODES D'ISOLEMENT ET D'ANALYSE DES EXOSOMES	17
2.1 MÉTHODES D'ISOLEMENT DES VÉS (EXOSOMES)	17
2.2 TECHNIQUES D'ANALYSE PHYSIQUE ET COMPOSITIONNELLE DES VÉS	19
2.2.1 « <i>Nanoparticle tracking analysis</i> » (NTA)	20
2.2.2 <i>Western blot</i>	21
2.2.3 <i>Microscopie électronique à transmission (MET)</i>	21
2.2.4 <i>Cytométrie en flux (CytoFLEX S, Beckmann)</i>	22
2.2.5 <i>Méthodes d'imagerie et de marquage des exosomes</i>	24
CHAPITRE 3 : LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE (BHE)	27
3.1 DEFINITION DE LA BHE :	27
3.2 CONSTITUTION DE LA BHE :	28
3.2.1 <i>Les cellules endothéliales (CEs)</i>	28
3.2.2 <i>Les protéines de jonctions</i> :	29
3.2.3 <i>Les péricytes (PCs)</i>	30
3.2.4 <i>Les astrocytes (ACs)</i>	31
3.3 LE TRANSPORT SÉLECTIF DE LA BHE	32
3.3.1 <i>La diffusion passive</i>	32

3.3.2	<i>La diffusion facilitée</i>	33
3.3.3	<i>Le passage actif</i>	33
3.3.4	<i>L'endocytose et la transcytose</i>	33
3.4	MODELE DE LA BHE IN VITRO	34
3.5	MODELES IN VIVO DE LA DISTRIBUTION CEREBRALE DES VES.....	35
HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....		37
1.	PROBLÉMATIQUE	37
2.	HYPOTHÈSE.....	37
3.	OBJECTIFS DE RECHERCHE	37
SECTION 2 : ARTICLE.....		39
	RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS	42
	VERSION ORIGINALE DE L'ARTICLE.....	43
	ABSTRACT	43
	1.INTRODUCTION	45
	2.MATERIALS AND METHODS	47
	3.RESULTS.....	57
	4.TABLE AND FIGURES	60
	5.DISCUSSION AND CONCLUSION (ARTICLE)	70
	6.REFERENCES:.....	75
SECTION 3 : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES		78
1.	DISCUSSION ET PROPOSITIONS	78
2.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	82
LISTE DES RÉFÉRENCES.....		83

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-1 RESUME DES CARACTERISTIQUES DE DIFFERENTS TYPES VES DECRITES DANS LA LITTERATURE. 2

Tableau 2-1 Résumé des différentes méthodes d'imagerie et d'étiquetage des exosomes.....25

Tableau 3-1 Liste des lignées des cellules endothéliales d'origine cérébrale décrites dans la littérature37

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE DIFFERENTES POPULATIONS VESICULAIRES DANS LE MILIEU EXTRACELLULAIRE (KRÄMER-ALBERS & FRÜHBEIS, 2013).....	1
FIGURE 1-2 IMAGES DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE QUI REPRESENTENT L'ENDOCYTOSE DE LA TRANSFERRINE MARQUEE A L'AUTf PAR DES VESICULES ENROBEES DANS LES RETICULOCYTES. MODIFIE DE (HARDING ET AL., 1983).....	4
FIGURE 1-3 CHRONOLOGIES DES PREMIERES PROGRESSIONS DANS LE DOMAINE DES EXOSOMES DEPUIS 1981 JUSQU'AUJOURD'HUI (ILLUSTRATION PERSONNELLE).....	5
FIGURE 1-4 REPRESENTATION GRAPHIQUE DU NOMBRE DE PUBLICATIONS CONCERNANT L'ETUDE DES « EXOSOMES » PAR ANNEE (1973-2020).....	6
FIGURE 1-5 REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DE LA FORMATION DES ILV PAR UN MECANISME DEPENDANT DE LA MACHINE ESCRT (WOLLERT & HURLEY, 2010).....	7
FIGURE 1-6 . ILLUSTRATION D'UN MODELE DE DEVELOPPEMENT DES ILV INDEPENDAMMENT DES COMPLEXES ESCRTs (STUFFERS ET AL., 2009).....	8
FIGURE 1-7 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS MODES DE RECAPTAGE DES EXOSOMES DANS LE MILIEU EXTRACELLULAIRE PAR LES CELLULES RECEPTRICES (LE LAY ET AL., 2018).	10
FIGURE 1-8 SCHEMA REPRESENTE LES PRINCIPALES COMPOSITIONS DES EXOSOMES. ADAPTE DE (LEE ET AL., 2012)	12
FIGURE 2-1 :SCHEMA REPRESENTANT LA METHODE GENERALE DE L'ISOLATION DES VES PAR ULTRACENTRIFUGATION VALABLE POUR TOUS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES ET POUR LES CELLULES. MODIFIE DE(THERY ET AL., 2006).	17
FIGURE 2-2 LES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES VESICULES EXTRACELLULAIRES	18
FIGURE 2-3 APERÇU DE TOUTES LES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES VESICULES EXTRACELLULAIRES	19
FIGURE 2-4 L'APPAREIL NTA AVEC UNE REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DETECTION DES NPs EN MODE FLUORESCENCE.....	20
FIGURE 2-5 ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX.	23
FIGURE 3-1 (A) IMAGE CORRESPONDANT AU CERVEAU. (B) SCHEMA REPRESENTANT UNE COUPE TRANSVERSALE DE L'UNITE NEUROVASCULAIRE AU NIVEAU DES CAPILLAIRES CEREBRAUX, REPRESENTANT DES CELLULES ENDOTHELIALES ENTOUREES PAR DES PERICYTES, DES ASTROCYTES ET DES NEURONES. MODIFIE DE (ABBOTT, 2013)	27
FIGURE 3-2 REPRESENTATION SIMPLIFIEE DES PROTEINES DE JONCTIONS DE LA BHE (ABBOTT ET AL., 2010)..	29
FIGURE 3-3 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES VOIES DE DIFFUSION VIA LES CELLULES ENDOTHELIALES DE LA BHE, MODIFIE DE (ABBOTT ET AL., 2006).....	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : ATP-binding cassette
ACs : Astrocytes
ATP : Adénosine triphosphate
AuTf : Or colloïdal
BSA : sérum bovin
bEnd.3: Cellules endothéliales du cerveau de souris
BHE : Barrière hématoencéphalique
CD: cluster de différenciation
⁶⁴Cu : Cuivre (numéro atomique 64)
CEs : Cellules endothéliales
CECCs : Cellules endothéliales des capillaires cérébraux
CLDN : Claudine Endosomes
dH : Diamètre hydrodynamique
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique
ESCRT : Les complexes de tri endosomal nécessaires au transport
GFP : Protéine fluorescente verte
Gluc : Gaussia princeps
ILV : Les vésicules intraluminales
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ISEV : Société internationale des vésicules extracellulaires
LCR : Le liquide céphalorachidien
MET: Microscopie électronique à transmission
MVs : Microvésicules
MVB : Endosome multivésiculaire
MA : Maladie d'alzheimer
MP : Maladie de Parkinson
NTA: Analyse du suivi des nanoparticules
NPs : Nanoparticules
NOP : Nanoparticules d'or
OATP2 : Transporteurs d'anions organiques

OCT : Transporteurs de cations organiques
PCs : Péricytes
PJ : Protéines de jonctions
PJS : Protéines de jonctions serrées
PJA : Protéines de jonctions d'adhésion
PVDF : Polyfluorure de vinylidène
QOC : Quantique Or-Carbone
PEG : Polyéthylène glycol
PQ Si : Points quantiques de silicium
SEC : Chromatographie d'exclusion de taille
SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SNC : Système nerveux central
SLC : Protéines transporteuses de support de soluté
TO : Tomographie assistée par ordinateur
TEP : Tomographie par émission de positons
UNV : unité neurovasculaire
UC : Ultracentrifugation
USPION5 : Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique
VEs : Vésicules extracellulaires
WGA : Agglutinine
WB: Western Blot
ZO : zonula occludens

RÉSUMÉ

Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des nanovésicules libérées par divers types de cellules. Il existe 3 principaux types de VEs qui diffèrent par leurs tailles et leurs sites de biogenèse : les corps apoptotiques (1-10 μm), les microvésicules (0,1-1 μm) et les exosomes (40-150 nm). Ces derniers sont capables de transporter une variété de molécules biologiques (lipides, ARNs et protéines) et jouent un rôle important dans la communication intercellulaire. Plusieurs études suggèrent que les VEs peuvent traverser la barrière hématoencéphalique (BHE). Cependant les évidences sont indirectes et les mécanismes responsables de ce transport sont encore inconnus. Nous émettons l'hypothèse que les VEs plasmatiques humaines issues de sujets sains sont capables de franchir la BHE de manière intacte et d'atteindre le système nerveux central. Les objectifs de l'étude sont d'isoler les VEs plasmatiques, les caractériser et d'analyser leurs perméabilités à travers la BHE sur un modèle *in vitro* et *in vivo*. Les caractérisations se déroulent en quatre étapes : soit la microscopie électronique pour la morphologie, les « Western blot » pour la présence de marqueurs vésiculaires et la technique de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) pour la détermination de leurs concentrations et de leur taille. Dans la deuxième partie, nous avons mis au point un protocole de marquage des VEs avec un fluorophore spécifique des bicouches phospholipidiques. L'efficacité du marquage a été vérifiée par microscopie confocale, Nanoparticle tracking Analysis et par cytométrie en flux. Un modèle de BHE *in vitro* basé sur les cellules vasculaires endothéliales murines bEnd.3 a été établi. Ce modèle nous a permis d'étudier l'internalisation des VEs fluorescentes et d'évaluer l'efficacité de leurs passages à travers cette barrière. Finalement, les VEs marquées ont été injectées dans la circulation de larves de Zebrafish afin d'évaluer leur biodistribution. En conclusion, on a révélé que les VEs, provenant de sujets sains, sont internalisées dans les cellules bEnd.3, qu'elles sont capables de franchir la monocouche de cellules endothéliales *in vitro* et passer du sang vers le cerveau dans un modèle *in vivo*.

Mots clés : vésicules extracellulaires (VEs), cellules endothéliales du cerveau de souris (bEnd.3), PKH67, barrière hématoencéphalique (BHE).

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre 1 : LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES

1.1 Définition :

Le terme vésicules extracellulaire (VEs) définit une famille hétérogène des vésicules membranaires de différentes tailles et contenus, sécrétées par toutes les cellules eucaryotes (Raposo & Stahl, 2019) (figure 1-1). Les VEs peuvent être détectées dans tous les fluides biologiques (Paolicelli *et al.*, 2019).

Les premiers rapports décrivant l'existence des VEs dans le plasma humain remontent aux années soixante-dix. Peter Wolf a identifié par microscopie électronique des minuscules particules riche en lipides de l'ordre 20-50 nm d'origine plaquettaire, des «poussières de plaquettes». Cette poussière de plaquettes était nécessaire pour la génération de thrombine de la même manière que les plaquettes (Wolf, 1967).

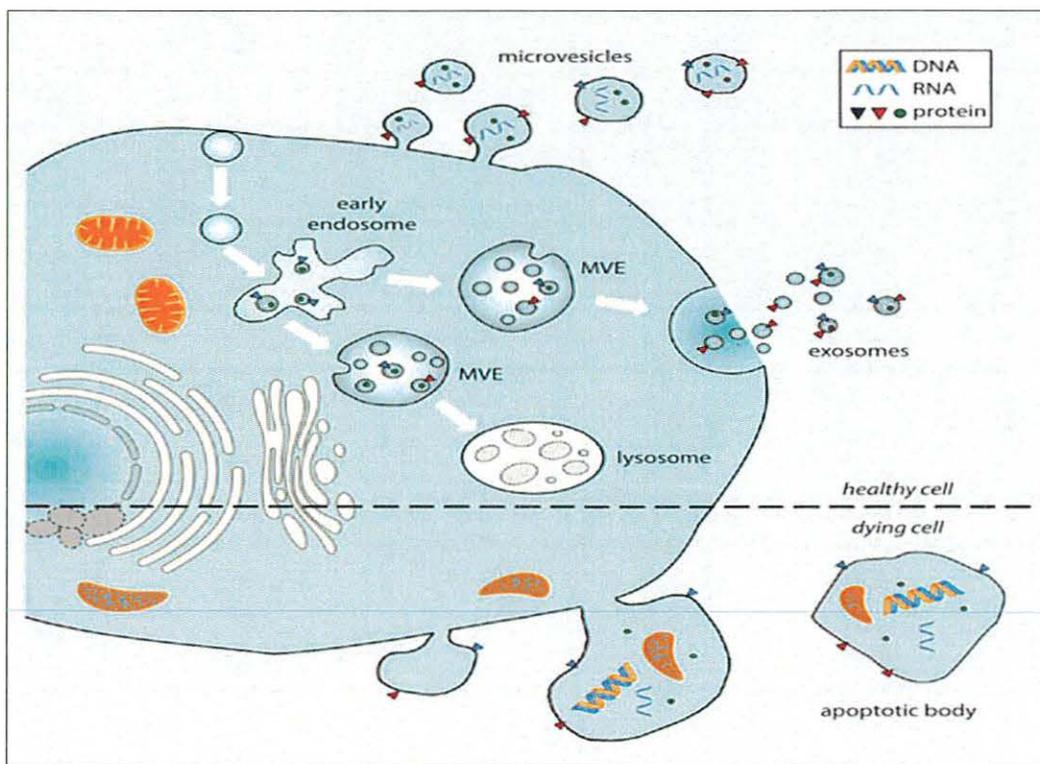


Figure 1-1 Représentation schématique de différentes populations vésiculaires dans le milieu extracellulaire (Krämer-Albers & Frühbeis, 2013). Cette figure montre

l'origine et l'hétérogénéité des VEs dans un milieu extracellulaire. Les cellules saines et apoptotiques sécrètent les VEs.

1.2 Les différentes populations des vésicules extracellulaires :

Les VEs diffèrent par l'origine, la composition et la taille (tableau 1-1).

Tableau 1-1 Résumé des caractéristiques de différents types VEs décrites dans la littérature.

Type des vésicules	Biogenèse	Taille (nm)	Marqueurs	Contenu	Références
Microvésicules	Libérer directement par la membrane plasmique.	150-1000	CD40 , intégrines, sélectines, ARF6, VAMP3	Acides nucléiques (ARNm, miARN et autres ARN non codants) et protéines	(Muralidharan-Chari <i>et al.</i> , 2009) , (Heijnen <i>et al.</i> , 1999) , (Cocucci <i>et al.</i> , 2009)
Exosomes	Voie endolysosomale, lors de la fusion du corps multivésiculaire avec la membrane plasmique	30-150	Tsg101, CD63, CD9, la flotilline-1 et Alix	Lipides, protéines et acides nucléiques	(Li <i>et al.</i> , 2017) , (Colombo <i>et al.</i> , 2014), (Nath Neerukonda <i>et al.</i> , 2019)
Corps apoptotiques	Bourgeonnement extérieur de la membrane plasmique.	500-2000	Annexine V, phosphatidylsérine	Fractions nucléaires, organites cellulaires	(Stolzing & Grune, 2004) , (Elmore, 2007)

1.2.1 Les microvésicules (MVs)

Les microvésicules sont produites directement par le bourgeonnement et la sécrétion de vésicules membranaires à partir de la membrane plasmique et, par conséquent, leurs marqueurs de surface dépendent largement de la composition de la membrane plasmique d'origine (figure 1-1).

En outre, elles tendent à constituer une population plus large et plus hétérogène de vésicules extracellulaires, allant de 150 à 1000 nm de diamètre. Cependant, il a été démontré que, tout

comme les exosomes décrits plus bas, ces vésicules libèrent des ARNm, des miARN et des protéines fonctionnelles aux cellules receveuses (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009).

1.2.2 Les corps apoptotiques

Les cellules en phase de mort programmée libèrent des corps apoptotiques (figure 1-1) contenant de l'ADN, de l'ARN et des fragments de mitochondries dans le milieu extracellulaire (Krämer-Albers & Frühbeis, 2013).

Ce sont des vésicules très hétérogènes, de l'ordre de 0,5 à 2 µm, qui ne partagent pas les mêmes caractéristiques morphologiques et biochimiques avec les exosomes.

1.2.3 Les exosomes

Au début des années quatre-vingt, l'équipe de Trams a utilisé pour la première fois le terme « exosome », pour décrire des vésicules qui ont une activité 5' nucléotidase et qui sont exfoliées de la membrane plasmique de plusieurs lignées cellulaires d'origine murine (neuroblastome N-18) (gliome C-6) et humaine (mélanome). Les analyses en microscopie électronique révèlent deux types de vésicules, différentes en taille et en morphologie soit celles comprises entre 0,5 et 1 µm de diamètre et celles de l'ordre de 40 nm de diamètres. À cette époque, les chercheurs ont suggéré que ces vésicules pouvaient avoir une fonction physiologique (Trams *et al.*, 1981).

En 1983, les chercheurs ont élaboré des notions fondamentales pour la compréhension de la biogenèse des exosomes ainsi que leurs actions physiologiques. Cette compréhension a été possible grâce à l'étude du cheminement du récepteur de la transferrine des réticulocytes de mouton (Pan & Johnstone, 1983) ou de la transferrine de rat (Harding *et al.*, 1983).

Pour la première fois, l'équipe de Pan a réussi à isoler les vésicules de mouton par ultracentrifugation à 100 000 x g. Le récepteur de la transferrine dans les vésicules libérées par les réticulocytes durant leurs maturations a été détecté par gel d'électrophorèse (Pan & Johnstone, 1983).

D'autre part, le groupe de Harding a marqué la transferrine à l'or colloïdal (AuTf), et a pu ainsi montrer par microscopie électronique que l'endocytose de la transferrine commence dans l'endosome multivésiculaire (MVB) et mène à la libération de la transferrine à l'extérieur des

réticulocytes dans des nanovésicules (figure 1-2). La transferrine libérée est intacte après endocytose, ce qui suggère qu'elle a pu éviter la voie lysosomale (Harding *et al.*, 1983).

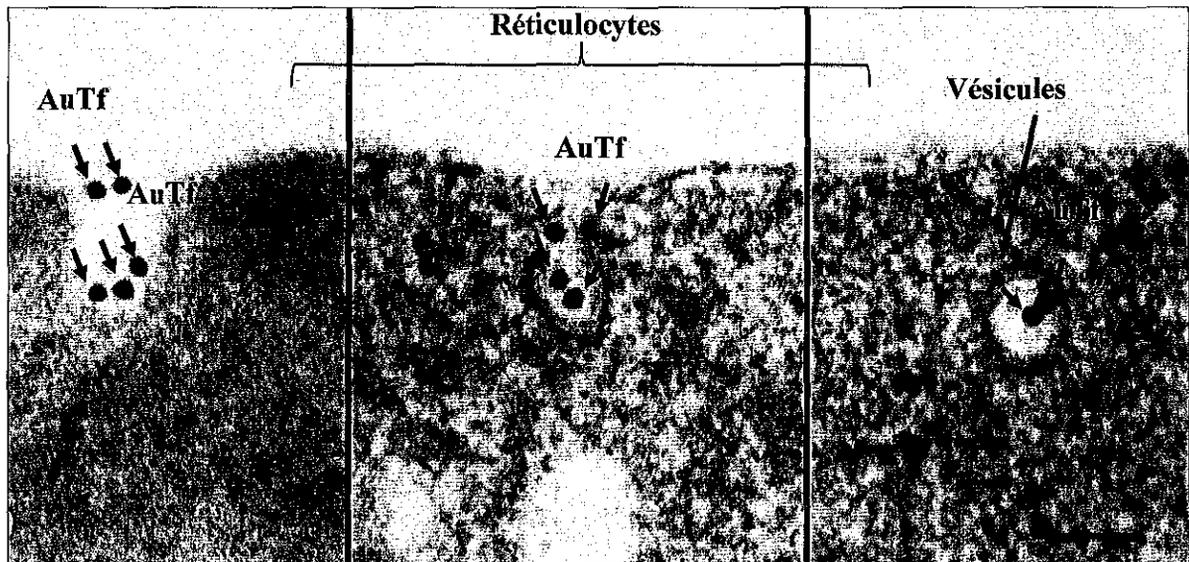


Figure 1-2 Images de la microscopie électronique qui représentent l'endocytose de la transferrine marquée à l'AuTf par des vésicules enrobées dans les réticulocytes. Modifié de (Harding *et al.*, 1983). Après 5 min d'incubation à 37°C des réticulocytes avec la transferrine conjuguée à l'or colloïdal (AuTf), ce marqueur est localisé à la surface libre des membranes plasmiques, puis à l'intérieur des vésicules enrobées qui ont une taille inférieure à 100 nm et à l'intérieur de petites vésicules non enrobées de taille variable entre 100 à 200 nm. Ces observations ont révélé un nouveau mécanisme de formation vésiculaire. Grossissement des images : x 155,000 (Harding *et al.*, 1983).

En 1986, l'équipe de Kassis a mis en évidence pour la première fois, la fonction physiologique des exosomes, plus particulièrement leurs effets sur la régulation de l'activité de l'adénylate cyclase (Kassis *et al.*, 1986). Les exosomes qui proviennent des cellules gliales C6 contiennent à la fois des récepteurs β -adrénergiques, les stimulants et les inhibiteurs de l'adénylate cyclase (Kassis *et al.*, 1986).

Au début des années quatre-vingt-dix, plus d'études ont été publiées sur le rôle et le contenu des exosomes. Ces derniers sont désormais considérés comme des véhicules de nucléosides et de l'acétylcholine estérase. De plus, ils ne contiennent pas des protéines associées aux lysosomes ou aux mitochondries (Johnstone & Ahn, 1990). La production des exosomes ne se restreint pas aux réticulocytes, mais elle prend place aussi dans les cellules embryonnaires de poulet et les globules rouges humains (Johnstone *et al.*, 1991).

Les exosomes ont un rôle dans le renouvellement des membranes plasmiques des cellules, par l'élimination des protéines non fonctionnelles (Johnstone, 1992). Les réticulocytes excrètent des exosomes formés à partir du MVB qui fusionne avec la membrane plasmique. Lors de leur maturation au stade des érythrocytes, ces cellules perdent progressivement un groupe de protéines, tel que le récepteur de la transferrine. Ces protéines perdues se trouvent dans les exosomes. En revanche les transporteurs d'anions sont retenus dans les érythrocytes, ce qui suggère un mécanisme de reconnaissance entre les protéines cellulaires et exosomales hautement sélectif (Johnstone, 1992).

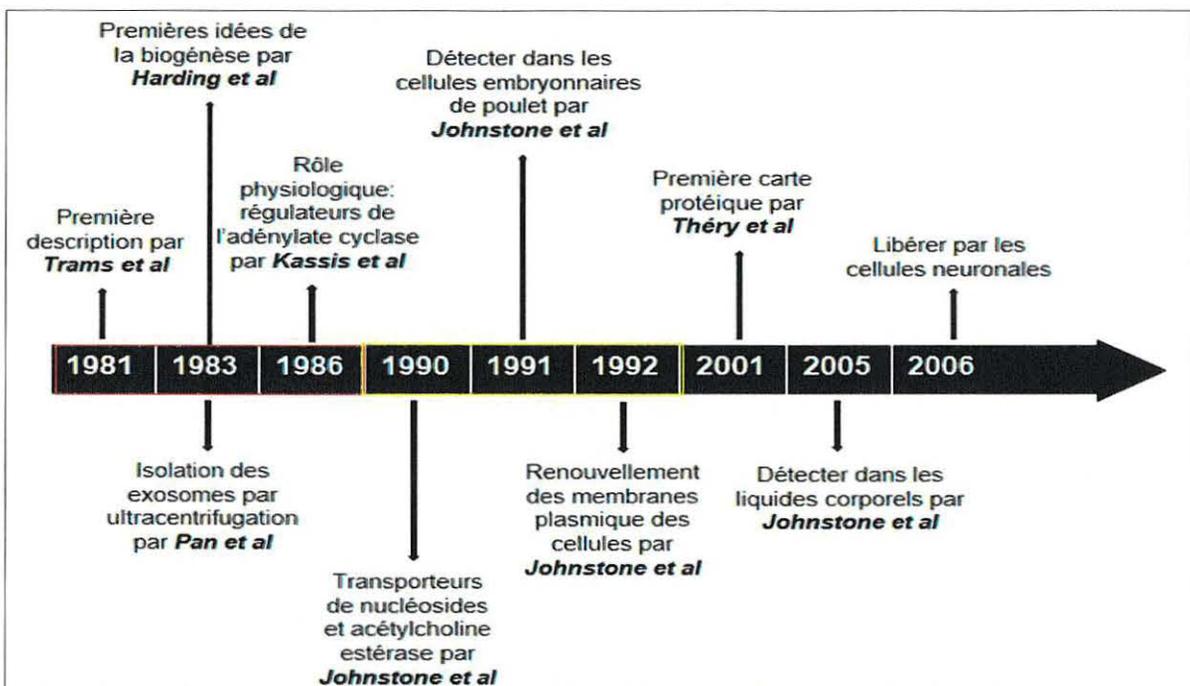


Figure 1-3 Chronologies des premières progressions dans le domaine des exosomes depuis 1981 jusqu'aujourd'hui (illustration personnelle).

Dans les années deux mille, le groupe de Clotilde Théry a présenté la première carte protéique constituée de 21 protéines qui sont particulières aux exosomes d'origine dendritique (Théry *et al.*, 2001). Il a été démontré par la suite que les exosomes se retrouvent dans tous les liquides corporels et peuvent servir comme un outil de diagnostic (Johnstone, 2005). Le contenu moléculaire des exosomes dépend de l'état et le type de la cellule source (Théry *et al.*, 2001).

L'attention drastique aux exosomes débutés il y'a quinze ans, ce qui reflète l'augmentation importante du nombre des études publiées à leurs propos (figures 1-3 et 1-4).

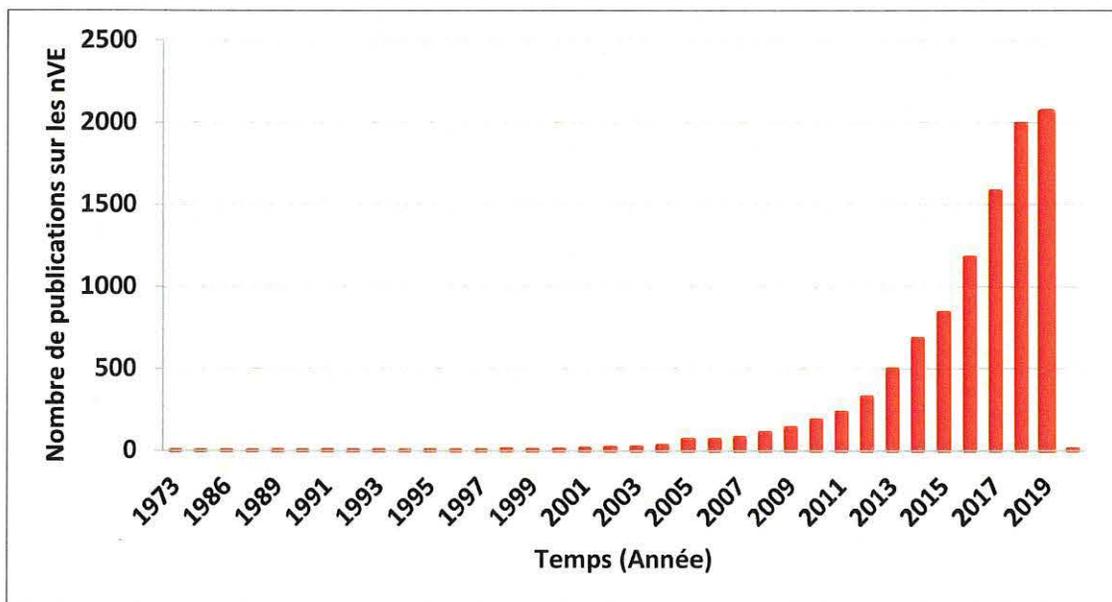


Figure 1-4 Représentation graphique du nombre de publications concernant l'étude des « exosomes » par année (1973-2020). (Illustration personnelle) à partir de (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=exosome>) .

1.2.3.1 Biogenèse des exosomes

L'origine du contenu des exosomes résulte des endosomes multivésiculaires "MVB". La formation des futurs exosomes et des vésicules intraluminales (ILV) dépend de plusieurs mécanismes. Le processus débute à la première invagination de la membrane plasmique par endocytose qui mène à la formation des vésicules de l'endocytose qui fusionnent avec l'endosome précoce (figure 1-1). Ces dernières deviennent des endosomes tardifs. La déformation de la membrane des endosomes forme des ILV et des MVB par la suite. Ces derniers sont responsables du tri des cargaisons ubiquitinées. Ils ont par la suite deux devenir possibles : ils peuvent directement fusionner avec les lysosomes ou à la membrane plasmique, donnant naissance aux exosomes (figure 1-1). Le mécanisme de formation des ILV est mieux décrit dans la littérature :

Les complexes de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT), représentent une machine constituée de plusieurs sous-unités responsables de la concavité et de la séparation de la

membrane en vésicules vers la lumière de l'endosome. Il existe cinq complexes de ESCRT apparent : ESCRT0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III et Vps4 (figure 1-5). Le processus commence par l'entrée de l'ubiquitine qui se trouve sur les protéines destinées aux MVB.

1.2.3.1.1 La voie de biogenèse dépendante du complexe ESCRT

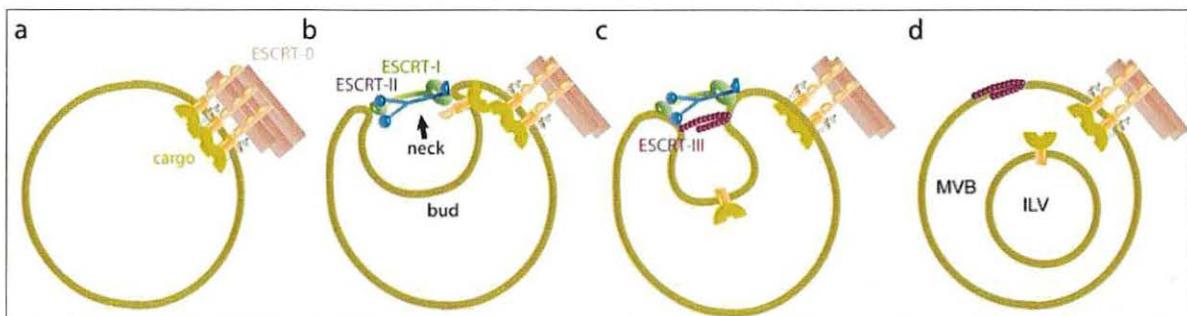


Figure 1-5 Représentations schématiques de la formation des ILV par un mécanisme dépendant de la machine ESCRT (Wollert & Hurley, 2010). a. Assemblage du complexe ESCRT-0 et la rétention du cargo; b. ESCRT I et II, par des sites de fixation à la membrane, participe à l'invagination de la membrane; c. ESCRT III est responsable du clivage de la vésicule; d. détachement des bourgeons membranaires dans la lumière du MVB, par conséquent, les ILV s'accumulent dans le lumen alors que le complexe ESCRT III est recyclé par le Vps4 (Wollert & Hurley, 2010).

Le complexe ESCRT-0 initie la voie MVB, par le regroupement des cargaisons suite à la reconnaissance de protéines transmembranaires monoubiquitinylées (figure 1-5a). Ce qui active le complexe ESCRT-I et ESCRT-II au niveau du cou pour le bourgeonnement de la membrane et la séquestration de la cargaison dans les bourgeons (figure 1-5b), et de l'ESCRT-III pour la scission des vésicules (figure 1-5c) et forme des ILV dans la lumière de l'endosome (figure 1-5d).

1.2.3.1.2 Voie de biogenèse non dépendante du complexe ESCRT

Les complexes ESCRT sont importants pour le tri des protéines endosomales et ils sont indispensables à la formation des ILV (figure 1-6a). Malgré tout, ces dernières sont toujours observées dans les MVB même en absence de la machinerie ESCRT. Cela veut dire que le mécanisme ESCRT n'est pas le seul responsable de la formation des ILV. Pour confirmer l'existence d'une voie de biogenèse des ILV indépendante du complexe ESCRT, l'équipe de Stuffers (Stuffers *et al.*, 2009) sont parvenus en premier lieu, à inactiver simultanément quatre protéines ESCRT : Hrs (ESCRT 0), TSG101 (ESCRT I), Vps22 (ESCRT II) et Vps24/CHMP3

(ESCRT III) (Stuffers *et al.*, 2009). Puis ils ont suivi la formation des MVE et le trafic des facteurs de croissance épidermique (EGF et EGFR) dans des cellules humaines (HeLa et HepG-2) à l'aide de la microscopie électronique et confocale.

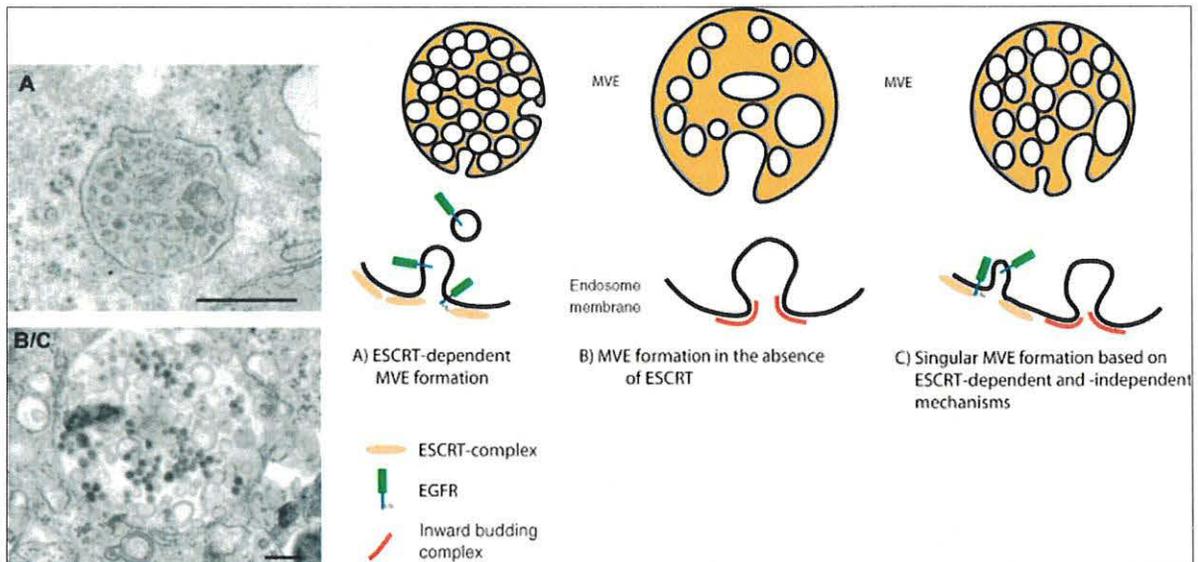


Figure 1-6 . Illustration d'un modèle de développement des ILV indépendamment des complexes ESCRTs (Stuffers *et al.*, 2009) .A) en présence des ESCRT, les MVB sont formés, ils contiennent des ILV homogènes dans lesquelles les récepteurs tels que l'EGF-R sont triés. B) En absence des complexes ESCRT fonctionnels, les MVB peuvent toujours se former par un mécanisme alternatif, ce qui conduit à la production des ILV hétérogènes. C) Il est possible que les MVB soient formés en parallèle par les deux mécanismes ESCRT-indépendant et ESCRT-dépendant (Stuffers *et al.*, 2009).

Ils ont constaté une altération importante de la morphologie des composants de la voie endocyttaire dans les cellules appauvries en ESCRT, mais les endosomes précoces et tardifs sont restés clairement différenciés. Par la suite, les travaux de Stuffers et ses collaborateurs ont démontré que l'inhibition du mécanisme ESCRT inactive la formation de MVB induite par l'EGF, mais n'empêche pas la biogenèse de MVB EGF-indépendants (Figure 1-6b).

Par contre, l'inhibition des quatre protéines de la machine ESCRT abolit l'internalisation de l'EGF-R dans les ILV, proposant que ce dernier soit adressé seulement dans les vésicules intraluminales formées de manière ESCRT dépendante (figure 1-6c). L'ensemble de ces résultats mène les chercheurs à proposer un modèle de biogenèse illustré dans la (figure 1-6).

1.2.3.2 Biogenèse des exosomes par autophagie

L'autophagie est un processus catabolique cellulaire physiologiquement important par lequel le matériel intracellulaire est dégradé par les hydrolases lysosomales (Vietri *et al.*, 2020). Le flux d'autophagie est réglé par diverses voies de signalisation et des facteurs de stress, tels que la famine, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'hypoxie, sont connus pour induire une autophagie (He & Klionsky, 2009).

Les principaux types d'autophagie, la macroautophagie, implique l'engloutissement du contenu cytoplasmique par un phagophore à double membrane, qui se ferme pour former un autophagosome. Lorsque l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome, le matériel séquestré se dégrade (Vietri *et al.*, 2020). La microautophagie est une voie autophagique alterne qui facilite la dégradation lysosomale des protéines grâce au bourgeonnement des lysosomes (Galluzzi *et al.*, 2017).

Les données existantes suggèrent qu'il existe de multiples interactions possibles entre le mécanisme d'autophagie et la biogenèse des exosomes par le biais de mécanismes moléculaires ou d'organites partagés, avec des implications importantes pour la physiologie normale et les états pathologiques (Galluzzi *et al.*, 2017; McAndrews & Kalluri, 2019; Vietri *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018). Griffiths *et al.*, ont montré que les autophagosomes pouvaient fusionner avec des MVB pour former l'amphisome et libérer des vésicules dans l'environnement externe (Griffiths *et al.*, 2012).

1.2.3.3 Libération des exosomes

La fin du processus de formation des ILVs donnera naissance aux exosomes (Alenquer & Amorim, 2015), qui vont être sécrétés dans le milieu extracellulaire. Cette libération implique en premier lieu, un transport de MVB à la membrane plasmique de la cellule, puis la fusion de l'MVB avec la membrane plasmique, qui libère les ILVs dans le milieu extracellulaire. La sécrétion des exosomes se produit de manière constitutive bien que le stress cellulaire ou les signaux d'activation puissent moduler leur sécrétion (Wollert & Hurley, 2010).

La sécrétion des exosomes par le biais de l'autophagie dépendante de l'interféron- γ (IFN- γ), induite par les amphisomes (Chen *et al.*, 2017). Le traitement à l'IFN- γ a provoqué la colocalisation de LC3B, CD63 et ANXA2 sur les amphisomes. Cette colocalisation et la libération des exosomes ultérieure dépendaient ATG5, Rab11 et RAB27A, ce qui suggère que la formation

de l'autophagosomes, MVBs et la fusion des amphisomes avec la membrane plasmique étaient essentiels pour le processus (Chen *et al.*, 2017). Le rôle de l'autophagie dans la libération des exosomes reste à élucider.

1.2.3.4 Recaptage des exosomes

Une fois que les exosomes sont libérés par les cellules émettrices dans le milieu extracellulaire, ils ont la capacité d'interagir avec des cellules réceptrices. À ce jour, les processus impliqués dans les interactions cellulaires ne sont pas encore clairs. Selon la littérature, quatre mécanismes d'interactions possibles sont suggérés, soit au niveau des interactions avec des récepteurs membranaires de la cellule réceptrice, ou par internalisation des exosomes par la cellule réceptrice (Le Lay *et al.*, 2018).

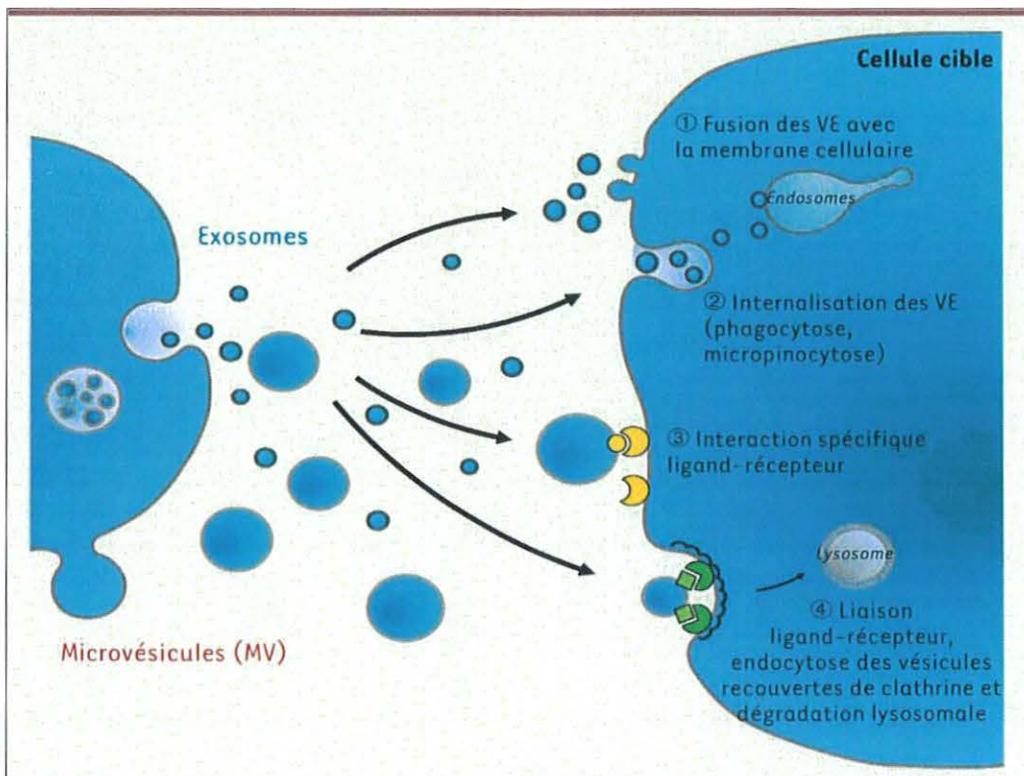


Figure 1-7 Représentation schématique des différents modes de recaptage des exosomes dans le milieu extracellulaire par les cellules réceptrices (Le Lay *et al.*, 2018). L'image représente le devenir des VEs après leurs libérations dans les fluides biologiques. Les VEs peuvent être internalisées dans la cellule réceptrice par différents mécanismes : 1. Les VEs peuvent fusionner directement avec la membrane plasmique, cela mène à la libération du contenu dans le cytosol. 2. Internalisation des VEs par phagocytose ou par micropinocytose. 3. Les VEs peuvent interagir directement avec des récepteurs spécifiques qui se trouvent à la surface de la cellule cible. 4. Les VEs peuvent être également endocytées par le biais de la

clathrine, cette dernière recouvre toute la surface des vésicules suite à une liaison de type ligand/récepteur. Après internalisation, les vésicules recouvertes par la clathrine seront dégradées dans les lysosomes (Le Lay *et al.*, 2018).

Les processus fondamentaux par lesquels les exosomes échangent leur contenu avec les cellules réceptrices n'ont pas été clairement déterminés jusqu'à présent.

Certaines études ont démontré que les exosomes peuvent fusionner avec la membrane cellulaire des cellules réceptrices, ce qui entraîne l'insertion du contenu intraluminal de l'exosome qui se déverse dans le cytosol de la cellule réceptrice (Barry *et al.*, 1998; Skog *et al.*, 2008).

Enfin, les exosomes peuvent pénétrer les cellules réceptrices par un mécanisme d'endocytose (phagocytose ou macropinocytose) (Le Lay *et al.*, 2018). Par la suite, les exosomes peuvent fusionner avec l'endosome dans le cytoplasme de la cellule réceptrice (figure 1-7).

1.2.3.5 Composition des exosomes

Les exosomes sont constitués d'une bicouche lipidique délimitant une variété de composés protéiques, lipidiques et d'acides nucléiques (figure 1-8). Plusieurs composés sont regroupés dans la base de données : <http://www.exocarta.org/>. Les exosomes transportent différents cargos résultant de leur processus de biogenèse (Kowal *et al.*, 2016b).

Les exosomes contiennent des protéines intervenant dans la sortie endosomale, telle que par exemple les tétraspanines (CD63, CD81 et CD9) ou Alix (ALG-2 interacting protein X) ou TSG101. Les exosomes peuvent contenir des lipides comme les phospholipides et du cholestérol (Wubbolts *et al.*, 2003). Différents types d'acides nucléiques (ADN, ARN, ARNm, ARN interférents ou petits ARN non codants) sont aussi véhiculés par les exosomes. Le type et l'état physiopathologique des cellules émettrices déterminent les constitutions et la structure des exosomes .

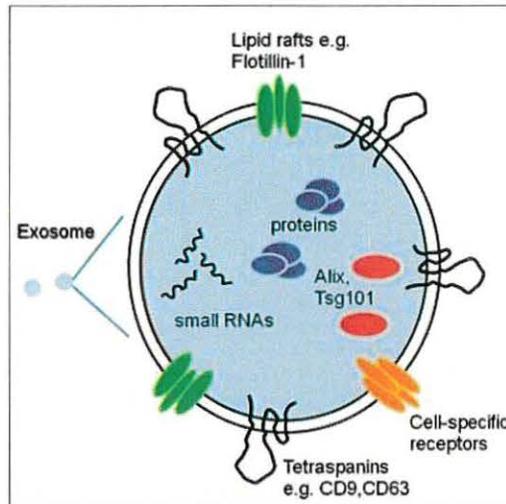


Figure 1-8 Schéma représente les principales compositions des exosomes. Adapté de (Lee et al., 2012)

1.2.3.6 La physiologie des exosomes

Les exosomes suscitent un intérêt croissant lié à leur capacité à transférer du contenu biologique entre les cellules. Les exosomes transportent plusieurs cargaisons biomoléculaires, y compris les matériels génétiques tels que l'ARNm et le miARN, qui peuvent être traduits ou réguler l'expression des gènes dans les cellules réceptrices ou cibles (Peterson *et al.*, 2015).

Les exosomes, émises dans l'espace extracellulaire, circulent via les différents fluides de l'organisme et modulent localement ou à distance les réponses des cellules avec lesquelles ils interagissent (Rashed *et al.*, 2017). De cette façon, les exosomes peuvent être impliqués dans des processus physiologiques normaux, tels que les fonctions neurobiologiques et la plasticité synaptique, les réponses immunitaires, la différenciation cellulaire, le maintien et la plasticité des cellules souches et la réparation tissulaire (El Andaloussi *et al.*, 2013b). De même, les exosomes jouent un rôle unique dans la propagation d'agents pathogènes tels que les virus et les prions (Duan *et al.*, 2019).

Les exosomes bousculent la vision traditionnelle de la communication intercellulaire et représentent ainsi un mode de communication alternatif et versatile, qui ouvre la porte à de nouveaux concepts et opportunités tant biologiques que thérapeutiques.

1.2.3.6.1 Rôle des exosomes dans la communication intercellulaire :

En tant que principale sous population des vésicules extracellulaires (VEs), les exosomes interviennent dans plusieurs fonctions, telles que la signalisation et la communication intercellulaire entre les cellules corporelles proches et distantes (Tkach & Théry, 2016). Certaines études ont rapporté que les exosomes sont non seulement impliqués dans le déclenchement de la signalisation en aval, mais ciblent spécifiquement les cellules réceptrices et échangent certaines protéines et certains acides nucléiques avec ces cellules (Yang & Robbins, 2011).

Les exosomes ont été reconnus pour avoir des rôles physiopathologiques dans des maladies telles que le cancer, les maladies infectieuses, les maladies auto-immunes, les maladies métaboliques et les maladies cardiovasculaires (Kim *et al.*, 2018). Les exosomes peuvent également favoriser la propagation des maladies neurodégénératives. En tant qu'outil de communication interneuronale, les exosomes peuvent non seulement contribuer à la plasticité synaptique locale, mais aussi permettre la communication au sein du SNC, influençant ainsi les réseaux neuronaux distants (Pérez *et al.*, 2019).

Cela pourrait promouvoir la propagation locale des maladies neurodégénératives dans le cerveau, car des exosomes contenant des formes agrégées mal repliées des protéines associées aux maladies neurodégénératives existent dans le liquide céphalorachidien et le sang des patients (El Andaloussi *et al.*, 2013a). Ces résultats suggèrent que les maladies neurodégénératives peuvent être transmises dans le cerveau via les exosomes (Pérez *et al.*, 2019).

La communication entre le sang et le cerveau est essentielle en raison de la forte demande métabolique des neurones (Schiera *et al.*, 2015). Par conséquent, les exosomes pourraient potentiellement servir de médiateurs majeurs dans ces communications entre les cellules de l'unité neurovasculaire (UNV). Comme toutes les cellules de l'UNV ont le potentiel de communiquer de manière unidirectionnelle ou bidirectionnelle entre plusieurs types de cellules.

Sur la base de leur contenu intégral, les exosomes jouent un rôle important dans la promotion de la progression tumorale via leurs capacités à stimuler la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, le remodelage de la matrice extracellulaire, les métastases et à favoriser l'évasion de la surveillance immunitaire (Xu *et al.*, 2017). Les cellules de gliome, par exemple, peuvent sécréter des exosomes contenant EGFRvIII qui peuvent favoriser la croissance de cellules receveuses qui n'ont pas cette variante de récepteur de facteur de croissance épidermique tronqué par l'activation de voie de signalisation transformante, tel que les voies Akt et la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) (Al-Nedawi *et al.*, 2008).

Il est important de noter que les exosomes peuvent propager de nombreux agents pathogènes, notamment le VIH et les virus du groupe Herpesviridae, tels que le virus d'Epstein-Barr, le virus de l'herpès simplex, le cytomégalovirus, les virus de la varicelle et du zona. De plus, les exosomes ont été proposés pour être un mécanisme permettant de délivrer les molécules de *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Mycobacterium* spp et *Salmonella Typhimurium*, via la livraison sélective de cargaisons dérivées d'agents pathogènes aux cellules réceptrices (Schorey *et al.*, 2015).

Les exosomes peuvent activer ou supprimer les réponses immunitaires en étalant les composants microbiens et donneurs au-delà de la cellule infectée. En outre, les exosomes dérivés de cellules infectées pourraient interagir avec des cellules non immunitaires, notamment des cellules épithéliales, des fibroblastes, des cellules mésenchymateuses, des plaquettes et des cellules vasculaires et pourraient ainsi influencer l'issue d'une infection (Schorey *et al.*, 2015). Les exosomes induisent la libération de cytokines et de chimiokines par les cellules endothéliales et contribuent à la propagation de cascades proinflammatoires endothéliales.

En revanche, les exosomes isolés des cellules endothéliales apoptotiques, des plaquettes, des cellules progénitrices endothéliales ou du muscle ischémique ont montré certains effets bénéfiques, tels que la stimulation de la prolifération endothéliale, la migration, la formation et la réparation endothéliale. Ces fonctions bénéfiques des exosomes sont altérées par le diabète (Amabile *et al.*, 2014).

Les exosomes endothéliaux circulants sont également corrélés aux facteurs de risque cardiométaboliques, en particulier la dyslipidémie (Amabile *et al.*, 2014). Les exosomes sont élevés dans le syndrome métabolique et contribuent à ses manifestations physiopathologiques telles que les complications vasculaires, l'inflammation et la coagulopathie sanguine (Lakhter & Sims, 2015).

1.2.3.6.2 Exosomes comme réservoir de biomarqueur

Les exosomes peuvent être sécrétés par la plupart des cellulaires du corps, notamment les cellules du système nerveux central (SNC) dans le cas normal ou pathologique. Les exosomes circulent dans certains fluides biologiques, y compris le sang. Les exosomes pourraient avoir des applications expérimentales, cliniques et un fort potentiel pour contenir des biomarqueurs (Meng *et al.*, 2018). Le besoin conséquent d'identifier les maladies du SNC à un stade précoce et peut-

être plus traitable a alimenté la recherche sur les biomarqueurs exosomiques à base de sang (Winston *et al.*, 2018).

Les exosomes dérivés de différentes cellules du système nerveux contiennent des molécules ou des marqueurs cellulaires spécifiques, par exemple, les exosomes dérivés d'oligodendrocytes contiennent des protéines de la gaine de myéline; les exosomes neuronaux contiennent des protéines d'adhésion cellulaire et des sous-unités de récepteur; les exosomes dérivés des microglies portent des peptidases et des cytokines (Bavisotto *et al.*, 2019). Cela suggère que les exosomes ont la capacité de réguler et de maintenir l'homéostasie cellulaire fonctionnelle dans le cas normal et dans les conditions pathologiques (Bavisotto *et al.*, 2019).

Les exosomes pourraient permettre également un diagnostic et un suivi au cours du temps de différentes maladies, notamment les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA) (Haddad *et al.*, 2019a; Haddad *et al.*, 2019b) et la maladie de Parkinson (MP) (Cao *et al.*, 2017).

Mais d'un autre côté, les exosomes peuvent favoriser le mécanisme de la maladie plutôt que de l'arrêter, lorsqu'ils transportent et délivrent des molécules pathogènes à partir de la cellule de leur origine (Bavisotto *et al.*, 2019). Ce type de rôle pathogène des exosomes a été observé dans la MA et la MP, où les exosomes migrent via le sang et le liquide céphalorachidien (LCR) transportant des protéines mal repliées ou des molécules proinflammatoires (Campanella *et al.*, 2018; Quek & Hill, 2017).

Par exemple, la probabilité d'implication des exosomes dans la MA a été suggérée en premier lieu, par l'accumulation des protéines exosomales dans les plaques amyloïdes (Rajendran *et al.*, 2006). Le rôle des exosomes n'est pas encore clair, mais une possibilité est qu'ils pourraient favoriser la propagation des peptides bêta-amyloïdes et/ou aider à l'élimination des bêta-amyloïdes neurotoxiques des cellules (De Toro *et al.*, 2015; Pluta *et al.*, 2018).

En second lieu, la découverte d'une protéine tau hyperphosphorylée dans les exosomes du tissu neural en culture et dans le LCR humain (Pluta *et al.*, 2018), supporte l'hypothèse que les exosomes peuvent propager des tauopathies et provoquer la MA, contribuer à la perte cognitive.

En revanche, dans la MP, l'agrégation d'alpha-synucléine est le marqueur pathologique. Il a été démontré que cette protéine neuronale présynaptique est sécrétée par les exosomes et transférée à d'autres cellules normales (Danzer *et al.*, 2012; Levy, 2017), principalement des neurones et des astrocytes, dans lesquelles elle a eu des effets toxiques provoquant la mort des cellules réceptrices (Emmanouilidou *et al.*, 2010; Gupta & Pulliam, 2014).

Des études cliniques sur les exosomes chez les patients atteints de cancer du poumon et de mélanome ont déjà été réalisées (Lamparski *et al.*, 2002; Morse *et al.*, 2005). Une analyse comparative de la protéine exosomale a été réalisée dans divers types de cancer humain, les résultats ont montré que le CD63 qui appartient à la famille des tétraspanines était plus élevé dans les exosomes dérivés de cellules cancéreuses malignes que dans ceux dérivés de lignées cellulaires non cancéreuses, fournissant une preuve que le CD63 exosomal pouvait être un biomarqueur du cancer (Logozzi *et al.*, 2009).

Les exosomes existent également dans la salive humaine et pourraient être une source de biomarqueurs de maladies, car, ils contiennent des acides nucléiques et des protéines (Palanisamy *et al.*, 2010). Les protéines exosomales urinaires ont également été étudiées comme des biomarqueurs potentiels du cancer de la vessie et du cancer de la prostate (Nawaz *et al.*, 2014; Smalley *et al.*, 2008).

En somme, les biomarqueurs exosomaux sont encore en phase de découverte et de développement précoce, mais il est clair qu'ils ont un potentiel considérable pour une utilisation généralisée dans la prochaine génération de diagnostics cliniques.

Le domaine en développement du diagnostic exosomal devrait produire des méthodes innovantes de diagnostic moléculaire à base de biofluides qui peuvent contribuer de manière significative à une médecine personnalisée efficace.

Chapitre 2 : MÉTHODES D'ISOLEMENT ET D'ANALYSE DES EXOSOMES

2.1 Méthodes d'isolement des VEs (exosomes)

L'étude des vésicules est limitée par le manque de méthodes standardisées pour la purification et la concentration des vésicules extracellulaires. L'ultracentrifugation (UC) est la première technique approuvée pour l'extraction des VEs depuis 1983 (Pan & Johnstone, 1983). Le principe de cette dernière se repose sur une série de centrifugation différentielle (figure 2-1).

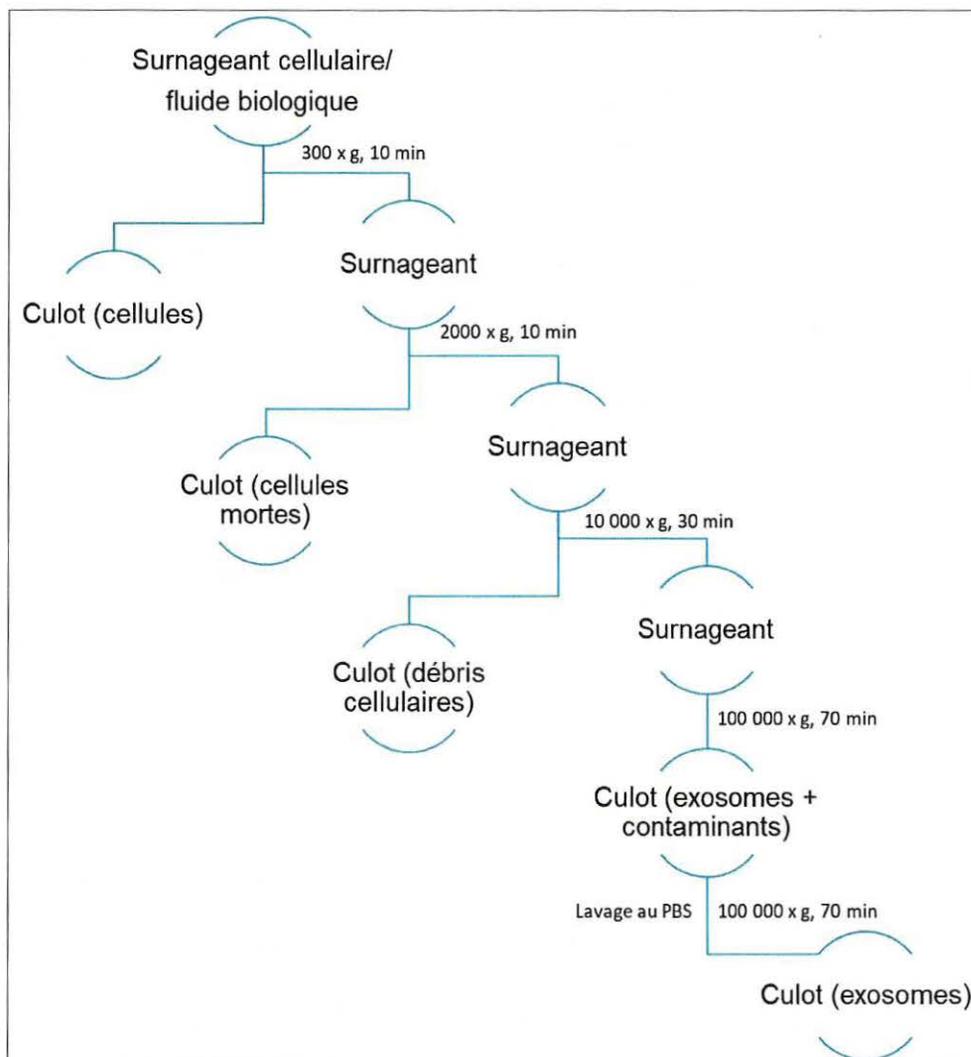


Figure 2-1 : Schéma représentant la méthode générale de l'isolement des VEs par ultracentrifugation valable pour tous les liquides biologiques et pour les cellules. Modifié de (Théry et al., 2006).

En premier lieu, la centrifugation à faible vitesse 2000 xg permet de se débarrasser des cellules mortes les autres contaminations lipidiques qui se trouvent dans le milieu. Ensuite, des centrifugations entre 10 000 ou 20 000 xg mènent à la récupération des vésicules de taille de l'ordre 30 nm à 1 µm et des débris cellulaires. Enfin, les petites VEs ou les exosomes sédimentent à une vitesse située entre 100 000 et 120 000 xg (Théry *et al.*, 2006).

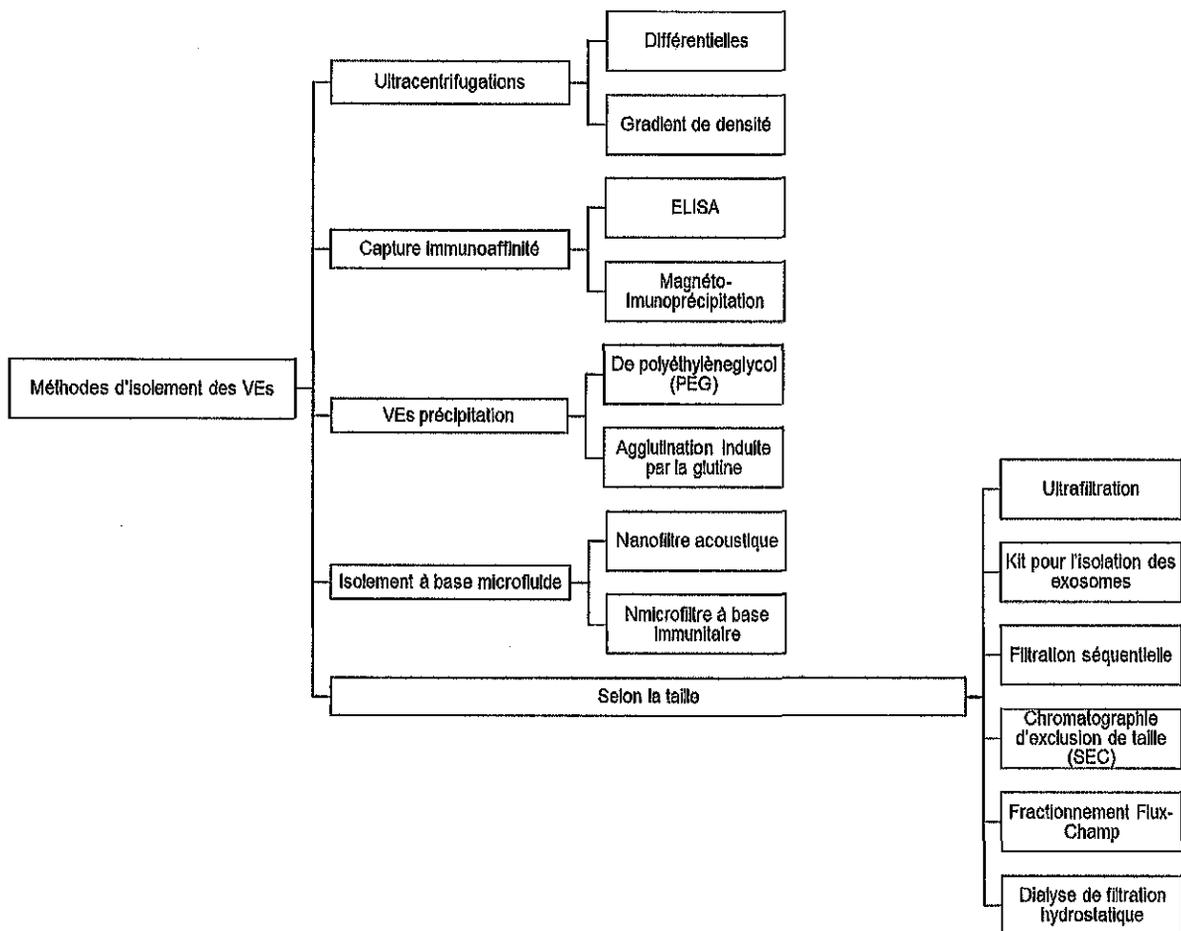


Figure 2-2 Les techniques d'isolement des vésicules extracellulaires (Illustration personnelle)

Des études ont montré que les VEs obtenues par UC contiennent des contaminations. Il est considéré qu'une population pure contenant 10^{10} VEs doit contenir une quantité de protéine aux alentours de 0,1 mg (Davidson *et al.*, 2017). De plus, l'UC demande beaucoup de temps, a un coût élevé et nécessite un niveau de compétence élevée pour être efficace. Cette technique n'est pas pas excellente, d'autres méthodes alternatives ont été développées afin de relever les défis liés à l'UC (Figure 2-2). La chromatographie d'exclusion de taille (SEC) est une autre méthode

de tri des VEs selon leurs tailles. La SEC (Takov *et al.*, 2019) et la méthode de précipitation EXO-Quick (Haddad *et al.*, 2019a; Haddad *et al.*, 2019b) sont des techniques qui donnent un rendement élevé de protéines extraites (VEs). En revanche, ces procédures de purification produisent plus de contaminants par rapport à l'UC (Tang *et al.*, 2017), (Takov *et al.*, 2019).

À l'heure actuelle, il n'existe pas une méthode de choix, peu couteuse, rapide et efficace et qui produise des préparations de VEs pures et bien différenciées. Pour définir les VEs cibles, il faudrait combiner deux méthodes différentes au minimum (Tang *et al.*, 2017). Cependant cela diminuerait le rendement des VEs finales.

2.2 Techniques d'analyse physique et compositionnelle des VEs

L'amélioration et la standardisation des protocoles d'isolement et d'évaluation des VEs demeurent un sujet non encore complètement résolu. Dans le but de déterminer la quantité, la composition, la forme et la taille des VEs, différentes méthodes de caractérisation sont mises en place (Doyle & Wang, 2019). Dans un premier temps, nous tons les techniques physiques et physicochimiques fréquemment utilisées dans la littérature (figure 2-3). Ensuite, nous décrivons une partie de ces techniques.

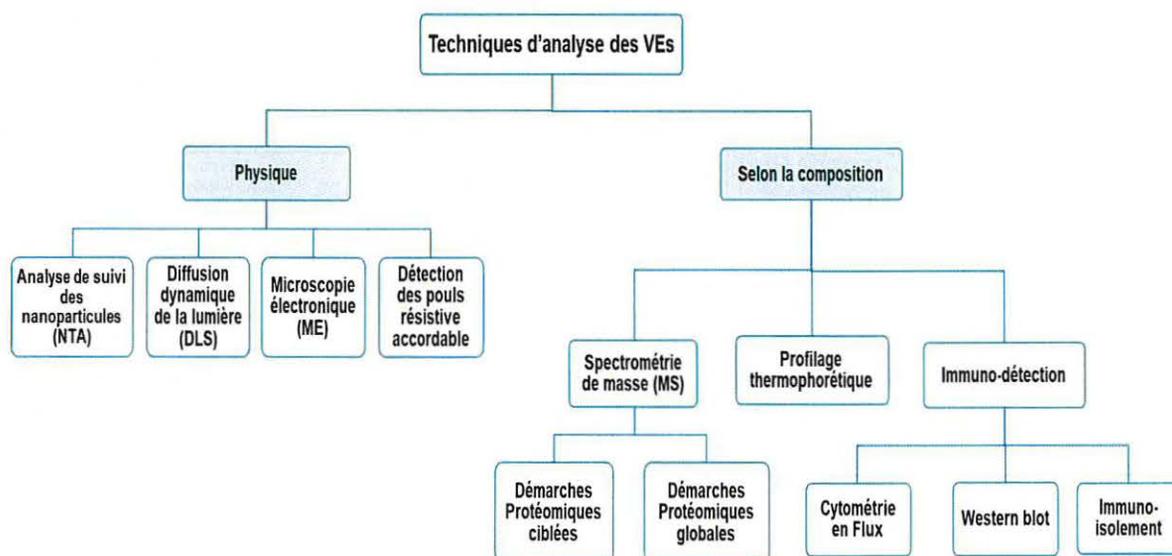


Figure 2-3 aperçue de toutes les techniques d'isolement des vésicules extracellulaires

2.2.1 « Nanoparticle tracking analysis » (NTA)

L'évaluation physique des particules colloïdales de tailles entre 10 nm à 1 µm est réalisée par l'analyse du suivi des nanoparticules (Nanoparticle tracking analysis ou NTA) en deux modes. Par les propriétés de diffusion de la lumière ou en fluorescence. Semblable à la technique de DLS (diffusion dynamique de la lumière), le NTA mesure le rayon des particules dans les solutions aqueuses.

Le principe de la méthode repose sur la dispersion des nanoparticules (NPs) dans un fluide. Les NPs sont soumises au mouvement brownien aléatoire. La vitesse de ce déplacement dépend de la taille, la température et la viscosité du liquide. La relation entre la diffusion des NPs et leur taille est exprimée par l'équation de Stokes-Einstein utilisée pour calculer le diamètre hydrodynamique (dH), selon le coefficient de diffusion mesuré.

D'autre part, le suivi de particules individuelles fluorescentes se fait par le passage d'un faisceau laser de longueurs d'onde, de 488 ou 532 nm à travers un verre à bord prismatique qui se trouve à l'intérieur de la cellule de l'échantillon (figure 2-4). Ce processus est enregistré sur vidéos par une caméra.

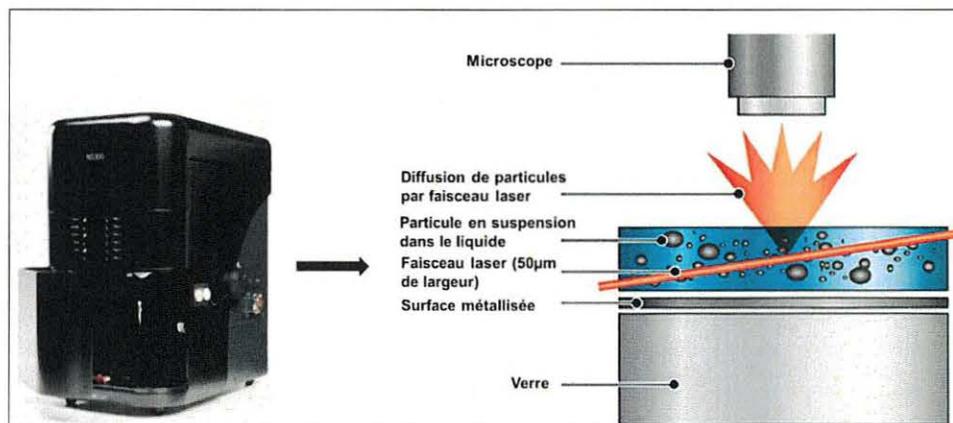


Figure 2-4 L'appareil NTA avec une représentation schématique de la détection des NPs en mode fluorescence

Le NTA est une technologie capable de mesurer simultanément la taille et la concentration des nanoparticules individuelles (NPs) en solution, en utilisant la diffusion de la lumière laser.

Le NTA permet de visualiser les particules individuelles et de suivre leur mouvement brownien, afin que les distributions de taille des particules basées sur les nombres, basés sur la mesure

des particules individuelles, soient développées en quelques secondes. De plus, il est possible d'analyser différents types de matériels biologiques et synthétiques comme les exosomes, les liposomes, les nanoparticules métalliques. Le NTA est capable de différencier l'hétérogénéité d'une population en taille. Il est possible d'utiliser le NTA pour les études d'agrégation de protéines de l'ordre de 1 μm au maximum.

Les principaux enjeux de NTA sont de distinguer facilement les particules d'un échantillon et les contaminations. Et aussi, il est impossible possible d'analyser simultanément les particules fluorescentes et non fluorescentes. Dans les cas des particules fluorescentes, il n'est pas possible d'analyser leur échantillon marqué avec deux fluorophores différents ou plus.

2.2.2 Western blot

C'est une méthode de biologie moléculaire classique pour l'analyse des protéines. Le Western Blot (WB) peut être utilisé pour démontrer l'expression de marqueurs de VEs, notamment TSG101, CD63 et CD9.

Le déroulement de la technique se fait en plusieurs étapes. Après l'isolement des vésicules, les VEs sont lysées et quantifiées par rapport à une gamme d'Albumine de sérum bovin (BSA). Les protéines après dénaturation par la chaleur, peuvent être séparées selon leurs tailles et leurs poids moléculaires par gel d'électrophorèse sur gel (SDS-PAGE) et ensuite transférées sur une membrane en nitrocellulose ou composée en polyfluorure de vinylidène (PVDF).

Cette dernière est bloquée par la BSA ou du lait avec un détergent, afin de limiter les interactions non spécifiques entre les anticorps et la membrane. La méthodologie de WB est parmi les méthodes d'analyse les plus fréquemment utilisées pour l'analyse des VEs en raison de sa facilité d'utilisation, de son accessibilité et de sa puissance à déterminer les protéines extra et intraexosomales.

L'inconvénient majeur de cette technique, l'utilisation d'une quantité importante de protéines pour avoir très peu d'informations.

2.2.3 Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission (TEM) reste la méthode de référence pour la visualisation des VEs, plus particulièrement les exosomes.

Les méthodes de microscopie électronique (ME) standard nécessitent une fixation chimique, de la déshydratation, un enrobage de résine, de l'observation sous vide et une coupe ultramince, ce qui est utilisé actuellement pour les tissus et les cellules. En effet, toutes ces étapes de préparation pourraient interférer avec une caractéristique importante des VEs (Ramirez *et al.*, 2018).

Dans le cas des exosomes, il est difficile d'obtenir cette coupe ultramince, car les membranes peuvent éclater lors de la préparation. En MET, un faisceau d'électrons est émis, accéléré et focalisé sur l'échantillon dans un environnement sous vide. La longueur d'onde des électrons peut atteindre une résolution de 1 nm. Plus la tension d'accélération est élevée, plus la longueur d'onde est courte, et donc on obtient une résolution meilleure, mais aussi étant plus dommageable pour les échantillons biologiques (Chiang & Chen, 2019). En somme, la visualisation des VEs par MET, couplée ou non à des techniques d'immunolocalisation, souffre principalement de deux défis majeurs: le manque de contraste et de préservation de morphologie des VEs. Ceci est particulièrement critique lorsque l'on considère le potentiel des VEs comme biomarqueurs dans les applications médicales (Ramirez *et al.*, 2018). En outre, la MET est une technique coûteuse, ça prend beaucoup de temps et nécessite une bonne expertise.

2.2.4 Cytométrie en flux (CytoFLEX S, Beckmann)

La cytométrie en flux est une technique de détection et de tri des cellules. Les cellules défilent devant un faisceau laser à grande vitesse. Le signal généré permet de les compter et de les caractériser. Cette technique est fiable pour traiter seulement des vésicules supérieures à 100 nm.

Avec l'évolution technologique, un nouvel appareil a permis d'abaisser la taille minimale détectée, permettant ainsi l'analyse d'objets de taille de l'ordre de celle des exosomes (figure 2-5). Ce qui rendu possible des analyses de manière fiable par tri cellulaire direct impossible avec les cytométries conventionnelles.

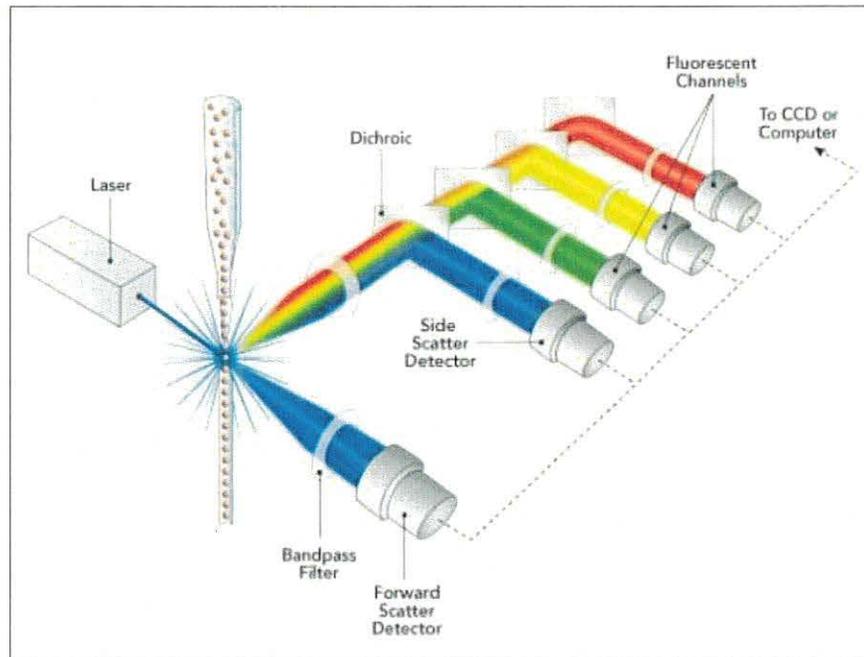


Figure 2-5 Illustration schématique du principe de la cytométrie en Flux.
<https://www.slideshare.net/adraiya/fcm-47862322>

Pour surmonter ce problème, une cytométrie en flux sensible aux nanoparticules (NPs) appelé CytoFlex. Ce dernier est un nanocytomètre en flux, peut être destiné à l'analyse individuelle des nanovésicules de l'ordre 80-150 nm (Brittain *et al.*, 2019).

La plate-forme CytoFlex est le premier système de cytométrie en flux avec une plage de bruit acceptable sur laquelle nous pouvons clairement démontrer une détection d'excitation et d'émission optimale des particules jusqu'à une taille de 80 nm en minimisant la perte de lumière et en maximisant la sensibilité (Brittain *et al.*, 2019).

Le potentiel qui rend cet instrument performant est sa capacité à combiner l'analyse des nanoparticules et la détection, d'une concentration de particules par millilitre d'échantillons analysés, jusqu'à 13 paramètres de fluorescence supplémentaires pouvant fonctionner simultanément.

Cependant, pour obtenir une mesure correcte, une configuration précise de l'appareil est requis. Aussi, en plus de l'absence d'un standard biologique, il faut prendre en considération la limite de détection qui s'arrête à des exosomes ayant une taille inférieure à 80 nm. Et nécessite des sondes fluorescentes de haute intensité pour détecter des marqueurs spécifiques.

2.2.5 Méthodes d'imagerie et de marquage des exosomes

L'imagerie des VEs plus particulièrement des exosomes joue un rôle crucial dans l'étude des propriétés protéomique et lipidique des exosomes, ce qui permet d'approfondir nos connaissances en biologie moléculaire, ainsi que de divulguer le potentiel thérapeutique de ces vésicules. L'imagerie *in vitro* sert à aider les chercheurs à comprendre les propriétés physiques des vésicules, telles que le mécanisme de libération et d'absorption des vésicules par les cellules. En revanche, l'imagerie *in vivo*, aide à dévoiler la biodistribution des vésicules, par exemple, la caractérisation des propriétés pharmacocinétiques des exosomes en tant que transporteurs des médicaments ou des molécules thérapeutiques. Cependant, l'imagerie et la surveillance des vésicules peuvent être difficiles à cause de leurs petites tailles, nécessitant souvent le marquage avant leurs visualisations. À l'heure actuelle, de nombreux outils d'imagerie et d'étiquetage *in vivo* et *in vitro* des VEs sont utilisés, tels que l'imagerie par bioluminescence, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et le marquage par fluorescence. Les avantages, les inconvénients et les capacités d'application pour chaque technique sont classés dans le (tableau 2-1).

Tableau 2-1 Résumé des différentes méthodes d'imagerie et d'étiquetage des exosomes.

Techniques d'imagerie	Marqueurs	Avantages	Inconvénients	Capacités	Références
Tomographie assistée par ordinateur (TO) des Traçages exosomes	Radiotracer 99 mTC-HMPAO GNPs	Haute résolution spatiale et temporelle	Marquage des exosomes purifiés	<i>In vivo</i>	(Hwang <i>et al.</i> , 2015)
	Nanoparticules d'or (NPO) enrobées de glucose	S'accumulent aux lieux des troubles cérébraux	Trouver la taille de NPO optimale		(Betzer <i>et al.</i> , 2018; Perets <i>et al.</i> , 2019)
Tomographie émission positons (TEP)	Exosomes modifié en Polyéthylène glycol (PEG) marqué au cuivre (⁶⁴ Cu)	Excellente qualité d'imagerie.	Étiquetage des exosomes isolés à partir des cellules		(Shi <i>et al.</i> , 2019)
Imagerie par résonance magnétique (IRM)	Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPION5)	Pénétration profonde, imagerie 3D de haute qualité des tissus avec détails anatomiques	Efficacité limitée de l'étiquetage	<i>In vivo</i>	(Hu <i>et al.</i> , 2015)
	Ultra-petites nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (USPIO)			<i>In vivo</i>	(Busato <i>et al.</i> , 2016)
Bioluminescence	Exosomes transfecté par la GFP (protéine fluorescente verte)	Haute sensibilité, faible bruit de fond, pas besoin de source d'excitation	Signal transitoire incapable de suivre à long terme	<i>In Vivo</i>	(Oh <i>et al.</i> , 2017)
	Gaussia princeps luciférase (Gluc)			<i>In Vitro</i>	(Lai <i>et al.</i> , 2014)

Techniques d'imagerie	Marqueurs	Avantages	Inconvénients	Capacités	Références
Fluorescence	Protéines fluorescentes codées génétiquement (Palm GFP)	Transport des exosomes multidirectionnels entre les cellules	Efficacité limitée de l'étiquetage	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	(Corso <i>et al.</i> , 2019) (Van Der Vos <i>et al.</i> , 2016)
	Fluorescents nanomatériaux : - Quantique Or-Carbone (QOC) - Points quantiques de silicium (PQ Si)	Excellentes propriétés optiques, fonctionnarisation avec groupe cible	Processus de synthèse fastidieux	<i>In vitro</i>	(Jlang <i>et al.</i> , 2018) (Zong <i>et al.</i> , 2018)
	Anticorps fluorescent : (anti-CD63 couplé à l'Alexa Fluor 647 nm)	Haute spécificité	Coût élevé. Non spécifique aux exosomes comme marqueur	<i>In vitro</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2016)
	Colorant organique : - Agglutinine de germe de blé (WGA), conjugué Alexa Fluor 488	Traçage fiable (axonal et dendritique) à haute résolution	Fiabilité de marquage courte ~ 24h	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	(Levy <i>et al.</i> , 2017) (Zhang <i>et al.</i> , 2019)
	Les carbocyanine à longue chaîne apolaires : PKH67 (vert) ou PKH26 (rouge)	Signal de fluorescence fort et durable, couleurs multiples.	Coloration d'autres entités lipidiques et fourniture d'un signal faux positif	<i>In vivo</i> / <i>In vivo</i>	(Pužar Dominkuš <i>et al.</i> , 2018)

Chapitre 3 : LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE (BHE)

3.1 Définition de la BHE :

La BHE est une interface dynamique et complexe qui se trouve entre le sang et le cerveau. Elle maintient l'homéostasie du système nerveux central (CNS) et la périphérie. La BHE est une barrière biologique constituée de plusieurs types cellulaires, notamment les cellules vasculaires et les cellules neuronales. L'ensemble de ces cellules forment l'unité neurovasculaire qui induit et maintient les propriétés de la BHE (figure 3-1).

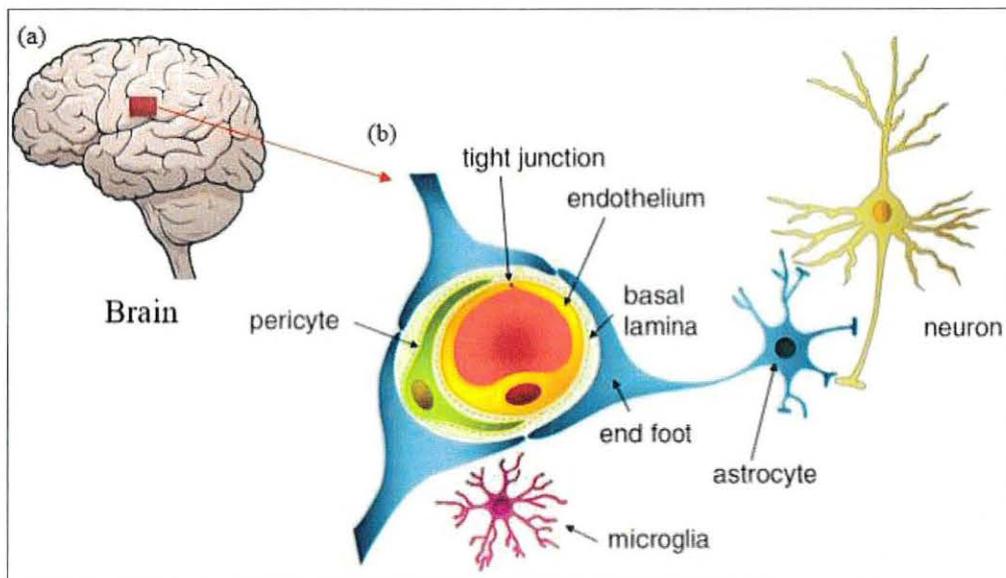


Figure 3-1 (a) Image correspondant au cerveau. (b) Schéma représentant une coupe transversale de l'unité neurovasculaire au niveau des capillaires cérébraux, représentant des cellules endothéliales entourées par des péricytes, des astrocytes et des neurones. Modifié de (Abbott, 2013)

3.2 Constitution de la BHE :

3.2.1 Les cellules endothéliales (CEs):

La première ligne de défense contre les facteurs circulant pour le cerveau est une monocouche de cellules endothéliales cérébrales qui sont connectées les unes aux autres. Ce sont des cellules microvésiculaires qui tapissent les parois internes de tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Aird, 2007).

Les CEs du cerveau sont des cellules très fines, la distance entre elles est inférieure à 4 μm ce qui correspond à l'espace interendothélial (Coomber & Stewart, 1985). Les CEs du SNC ont des propriétés uniques par rapport aux CEs des autres tissus qui leur permettent de réguler étroitement le mouvement des ions, des molécules et des cellules entre le sang et le SNC. Ces cellules sont maintenues entre elles par des complexes jonctionnels comprenant les jonctions adhérentes (JAs) et des protéines de jonctions serrées (PJs), qui limitent considérablement le flux de solutés paracellulaires (figure 3-2). Cette barrière paracellulaire et transcellulaire étroite crée une cellule polarisée avec des compartiments membranaires lumineux et abluminal distincts de sorte que le mouvement entre le sang et le cerveau peut être contrôlé par des propriétés de transport cellulaire réglementées (Betz *et al.*, 1980).

Bien que ce type de cellule spécifique soit le plus souvent modélisé comme la BHE *in vitro*, il existe d'autres types de cellules qui font partie de l'UNV ou qui affectent les fonctions de la BHE, y compris les neurones, les astrocytes et les péricytes (Rhea & Banks, 2019).

3.2.2 Les protéines de jonctions :

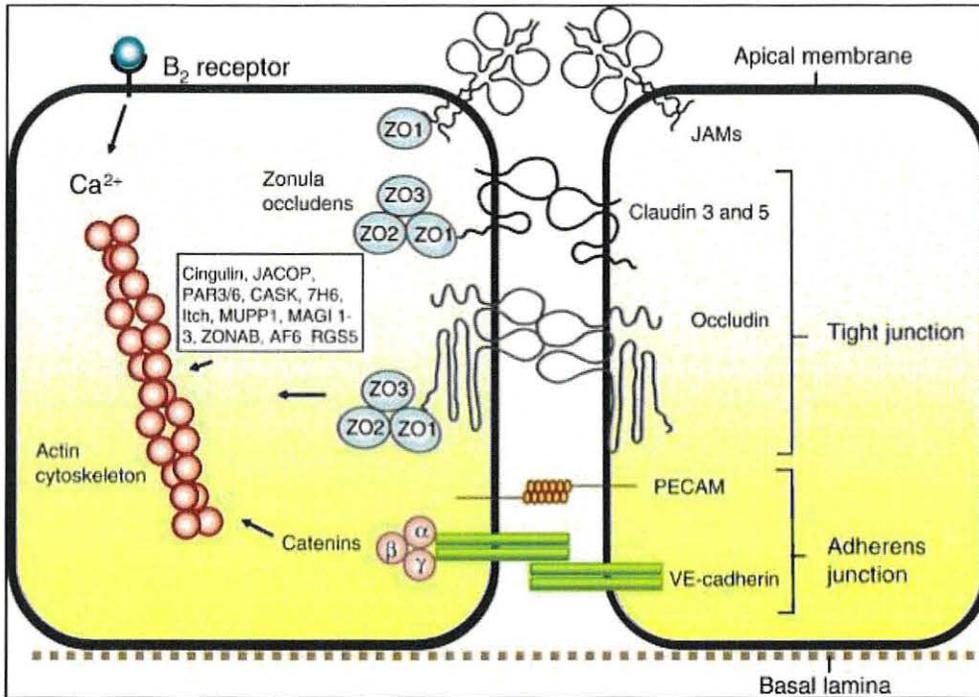


Figure 3-2 Représentation simplifiée des protéines de jonctions de la BHE (Abbott et al., 2010). Les cadhérines sont des PJA permettant de maintenir l'intégrité structurelle et la fixation entre les cellules, et sont nécessaires à la formation des PJ serrées. Ces derniers comprennent plusieurs types de protéines comme l'occludine et les claudines (cldn3 et 5). Toutes ces protéines sont liées aux protéines d'échafaudage Zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) qui se lient à leurs tours aux filaments d'actine et myosine de la cellule (Abbott et al., 2010a).

Les complexes de jonction endothéliale cérébrale sont constitués d'un ensemble de PJs, y compris l'occludine, les Claudine et les JAs, les protéines de jonction lacunaire, y compris les connexines, et les jonctions adhérentes, y compris la cadhérine, ainsi que d'autres protéines adaptatrices (Bauer & Traweger, 2016; Rajagopal et al., 2019).

Ces jonctions sont parmi les éléments imperméables et les plus restrictifs de l'organisme. Ce qui forme une résistance endothéliale contre les ions permet de polariser les compartiments laminaux et basaux (figure 3-2). Cette restriction protège le cerveau des substances nocives et maintient l'homéostasie cérébrale (Berndt et al., 2019).

Les Claudine sont des protéines membranaires intégrales avec quatre domaines transmembranaires et sont un composant structurel critique du joint BHE. La première boucle extracellulaire, la plus proche de la terminaison NH est importante pour le scellement de la BHE

via des interactions homotypiques et contiennent des sites de liaison ionique. L'extrémité COOH contient un domaine de liaison PDZ (Liu & Fuentes, 2019), qui interagit avec les protéines guanylate kinase appelée Zonula occludens (ZO) pour relier les Claudine aux composants du cytosquelette, y compris l'actine et la vinculine (Abrahamson & Ikonovic, 2020). De nombreuses isoformes de claudine ont été identifiées et sont spécifiques aux tissus. La Claudine-5 est un composant majeur et nécessaire de la BHE dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECCs) et a été le plus étudié dans le contexte de la MA (Abrahamson & Ikonovic, 2020).

L'occludine est un autre composant majeur des jonctions serrées et un élément régulateur central. L'occludine possède quatre domaines transmembranaires qui, comme la Claudine-5, interagissent de manière homotypique avec les occludines des cellules adjacentes (Abrahamson & Ikonovic, 2020). Relative à la composante neuroinflammatoire des lésions cérébrales et des maladies neurodégénératives, l'occludine serait requise pour les changements induits par les cytokines dans les jonctions serrées, y compris ceux induits par le TNF- α (Van Itallie *et al.*, 2010).

Les JAs sont des protéines transmembranaires uniques et des membranes de la famille des immunoglobulines. Comme la Claudine-5, les JAs ont des domaines PDZ et interagissent avec les protéines ZO (figure 3-2), les reliant au cytosquelette d'actine (Ebnet *et al.*, 2000). Les JAs sont importants dans l'assemblage des complexes de jonctions serrées et peuvent resserrer les fentes paracellulaires ainsi que réguler les interactions leucocytes-CEs (Ostermann *et al.*, 2002)

3.2.3 Les péricytes (PCs)

Découverte pour la première fois en 1873 par le physiologiste français Rouget, et ont donc été nommés les cellules de Rouget, mais renommées par la suite par Zimmermann en 1923 "péricytes" en raison de leur localisation unique dans l'espace périvasculaire des vaisseaux cérébraux. Le terme dont l'origine provient du préfix "péri" signifiant "autour de" et du suffixe "cyte" signifiant "cellule" (El Ali *et al.*, 2014). Les PCs sont des cellules appartenant à la lignée des cellules musculaires lisses qui couvrent complètement les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et se retrouvent attachées à des protéines de la matrice extracellulaire de la membrane de la lame basale (Bell *et al.*, 2010; Bonkowski *et al.*, 2011).

L'étude de la biologie cellulaire des PCs représente un grand défi en raison de l'hétérogénéité de ces cellules et du manque de marqueurs spécifiques qui exprimé uniquement par les PCs, et, par conséquent, ces cellules sont souvent confondues avec d'autres cellules qui se trouvent dans

l'espace périvasculaire (Armulik *et al.*, 2011; El Ali *et al.*, 2014). Il a été démontré que les PCs du SNC ont des propriétés uniques par rapport aux PCs des autres tissus. Les PC du SNC sont dérivées de la crête neuronale, contrairement aux PCs dans de nombreux tissus périphériques, qui sont issus du thème du derme (Majesky, 2007).

Les péricytes jouent un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse, la déposition de la matrice extracellulaire, cicatrisation des plaies, la régulation de l'infiltration des cellules immunitaires et la régulation du flux sanguin dans la réactivité neuronale, et les rapports suggèrent qu'ils peuvent également être des cellules souches multipotentes du SNC (Armulik *et al.*, 2011). De plus, ces cellules se sont révélées importantes pour réguler la formation de la BHE au cours du développement, ainsi que pour maintenir sa fonction à l'âge adulte et le vieillissement (Armulik *et al.*, 2011; Daneman *et al.*, 2010; Rhea & Banks, 2019).

3.2.4 Les astrocytes (ACs)

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes dans le SNC et ont diverses fonctions dans le maintien de la BHE, la formation des circuits neuronaux, fournissant un environnement pour aider à réguler tous les aspects de la fonction neuronale (survie, développement, métabolisme, neurotransmission) (García-Cáceres *et al.*, 2016). Cela comprend la régulation de la contraction / dilatation des cellules musculaires lisses vasculaires entourant les artérioles ainsi que les PCs entourant les capillaires (Janzer & Raff, 1987).

Au niveau de la BHE, les astrocytes aident à assurer l'entretien et la réparation grâce à la libération de plusieurs molécules effectrices (Bell *et al.*, 2012). Les astrocytes forment l'UNV entre les neurones et les CEs, et leur structure d'extrémité-pieds maintient l'homéostasie cérébrale en régulant l'absorption d'eau, d'acides aminés et de neurotransmetteurs (Akdemir *et al.*, 2020).

Les astrocytes ont également la capacité de surveiller l'activité locale en cours des circuits synaptiques avec leurs processus élaborés enveloppant les synapses et formant des synapses tripartites. Les astrocytes expriment des récepteurs de neurotransmetteurs qui détectent l'activité synaptique et y répondent en élevant le Ca²⁺ astrocytaire et en sécrétant des molécules neuroactives vers les synapses (Morel *et al.*, 2017)

3.3 Le transport sélectif de la BHE

Les PJS de l'endothélium sont extrêmement restreints pour le passage des molécules solubles dans l'eau. D'une manière générale, les molécules qui pénètrent la BHE doivent emprunter les voies transcellulaires de transport: diffusion passive, diffusion facilitée, le transport actif et le transport vésiculaires "endocytose et transcytose" (Abbott, 2013). (figure 3-3).

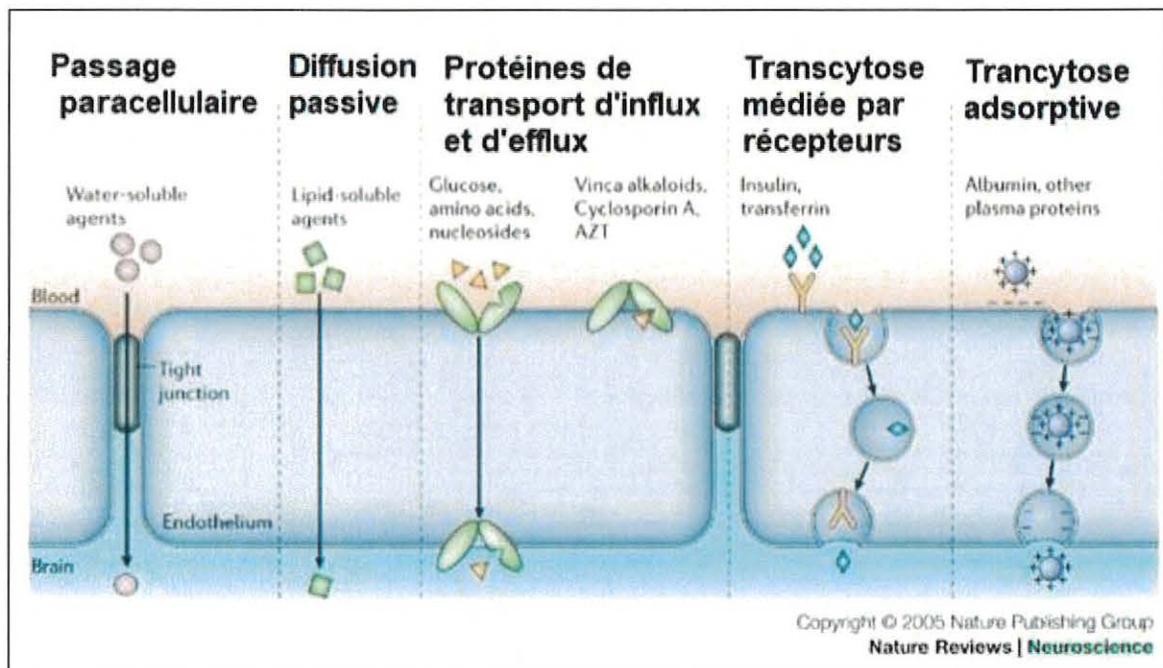


Figure 3-3 Représentation schématique des principales voies de diffusion via les cellules endothéliales de la BHE, modifié de (Abbott et al., 2006). Les PJs limitent sévèrement le trafic paracellulaire des molécules solubles. Le glucose et les molécules liposolubles, les protéines (par exemple, insuline et transferrine) ainsi que d'autres substances peuvent pénétrer l'endothélium par les voies transcellulaires (Abbott *et al.*, 2006).

3.3.1 La diffusion passive

La diffusion passive est un passage de petites substances lipophiles (comme la nicotine ou le dioxygène) à travers la BHE selon un gradient de densité entre le milieu extracellulaire cérébral et le sang. Ce processus ne nécessite ni transporteurs ni de dépense d'énergie.

3.3.2 La diffusion facilitée

La diffusion facilitée, se fait par l'intervention d'un certain nombre de transporteurs spécifiques qui facilitent le trafic des nutriments (tels que le glucose, les acides aminées et les nucléosides) au niveau de l'endothélium. Ce processus de diffusion, ne nécessite pas la consommation de l'énergie, et donc régules-en fonction du besoin métabolique du cerveau et les concentrations des molécules plasmatiques.

3.3.3 Le passage actif

C'est un mécanisme de trafic dépendant de l'énergie, et se fait en utilisant différents transporteurs protéiques d'influx et d'efflux. Ces transporteurs sont présents au niveau des membranes apicales et basales des cellules endothéliales et ils contrôlent le passage des molécules endogènes ou exogènes à travers la BHE.

- ***La pompe d'efflux: Transporteurs ABC (ATP-binding cassette)***

Ces protéines membranaires appartiennent majoritairement à la superfamille des transporteurs ABC, qui régulent la diffusion active des molécules du cerveau vers le sang. Ce processus fonctionne par l'hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP). Ces transporteurs ont un rôle important dans la protection de la BHE des substances nocives.

- ***La pompe d'influx: Transporteurs SLC (Solute carrier protein)***

Ce processus repose sur le transport des nutriments et d'autres molécules essentielles comme le glucose, du sang vers le cerveau. Parmi les transporteurs d'influx, on trouve quelques représentants de la famille des protéines SLC, tels que les transporteurs d'anions organiques (OAT et OATP2) et les transporteurs de cations organiques (OCT) (Ueno *et al.*, 2010).

3.3.4 L'endocytose et la transcytose

L'endocytose et la transcytose représentent les principales voies de transport des macromolécules, telles que les protéines et les lipides. L'endocytose est la première étape de la transcytose, durant laquelle les macromolécules pénètrent les cellules endothéliales de la BHE du

côté luminal vers le côté abluminal ou l'inverse. Après le déclenchement de ce processus, l'invagination de la membrane mène à la formation des vésicules de trafic intracellulaires (Abbott, 2013). En revanche, les études d'internalisation des exosomes. D'autre part, l'endocytose des exosomes, que ce soit par macropinocytose ou par des mécanismes médiés par les récepteurs, provoque toujours la livraison de la cargaison vésiculaire à la vie endosomale (Fitzner *et al.*, 2011). Il est suggéré que la macropinocytose est un mécanisme de clairance exosomale plutôt que de signalisation cellulaire. Les cellules dépourvues de capacité de présentation d'antigène peuvent présenter un mécanisme de dégradation de la membrane cellulaire par les cellules immunitaires (Mayor & Pagano, 2007). Par contre, l'endocytose médiée par des récepteurs spécifiques sur la membrane plasmique cellulaire, appelée aussi l'endocytose médiée par la clathrine, utilise des complexes de la clathrine et des protéines adaptatrices qui recouvrent la membrane et induisent l'invagination de la membrane dans une vésicule (Mayor & Pagano, 2007). Il est controversé de savoir si l'absorption des exosomes est spécifique au type cellulaire et si elle implique une fusion membranaire ou une endocytose.

3.4 Modèle de la BHE *in vitro*

Les modèles animaux peuvent être remplacés par différents modèles de BHE *in vitro* (Abbott *et al.*, 2008). Par exemple, les cellules endothéliales cérébrales immortalisées, utilisées comme des cellules primaires ou lignées des cellules endothéliales du cerveau immortalisées. De tels modèles sont utilisés pour un grand nombre d'espèces de mammifères, notamment le rat, la souris, le porc, la vache et l'être humain (tableau 3-1).

Pratiquement, un modèle de BHE *in vitro* idéal qui reproduirait tous les aspects de l'endothélium du cerveau humain *in vivo*, n'est pas atteint ou n'est pas réalisable. Car les cellules sont retirées de leurs microenvironnement cérébraux habituels et cultivées dans un système ou dans un milieu de culture manquant de nombreuses influences qu'elles ressentiraient normalement à la fois du côté du compartiment sanguin et du côté du cerveau. Néanmoins, une variété de modèles sont aujourd'hui disponibles, et entre eux, certains peuvent fournir des systèmes très utiles, pour étudier la physiologie de base, pour tester et quantifier les mécanismes de perméation. Cependant, la plupart des tests de perméabilité sont toujours effectués sur des systèmes statiques, avec des cellules cultivées sur un filtre poreux en configuration «transwell», qui offrent une meilleure résolution et quantification de la perméation tout en minimisant la quantité de composés requise.

Les modèles préservent généralement bien les protéines à jonction serrée et les mécanismes de transport qui ont été identifiés *in vivo*. Des lignées cellulaires immortalisées sont également disponibles pour de nombreuses espèces, y compris la lignée cellulaire hCMEC / D3 humaine et largement utilisée. Les modèles de lignées cellulaires utilisés pour les études de l'endocytose et de la transcytose de la BHE incluent les cellules bEnd.3 de souris et les hCMEC / D3 humain (Wen *et al.*, 2012), (Beard *et al.*, 2019).

3.5 Modèles *in vivo* de la distribution cérébrale des VEs

Les stratégies de traitement des maladies cérébrales par des médicaments cibles passant la BHE, doivent faire appel à de bons modèles expérimentaux imitant le plus fidèlement possible la BHE humaine. Une gamme de modèles et de techniques animaux a été développée généralement chez les rongeurs, et d'autres espèces de mammifères comme les singes, les porcs et les chiens (Kumar & Nerurkar, 2016).

Présentement, le poisson-zèbre est devenu un modèle animal idéal pour étudier des processus biologiques complexes, tels que la biologie du développement et de la croissance (Meyers, 2018). Plus précisément, la puissance d'utiliser la génération directe et inverse chez le poisson-zèbre est combinée à la facilité de générer un grand nombre d'embryons transparents. En plus, il s'agit du plus petit modèle vertébré avec une BHE fonctionnelle et un système vasculaire à base de cellules endothéliales. La gamme d'outils génétiques disponibles pour étudier le poisson-zèbre est comparable à ceux disponibles pour étudier les souris et faire du poisson-zèbre un modèle presque idéal pour examiner les interactions cellule-cellule *in vivo* (Meyers, 2018).

Une analyse des vaisseaux sanguins cérébraux chez les vertébrés révèle qu'il y a une barrière fonctionnelle entre la lumière des vaisseaux sanguins et le parenchyme du cerveau. Par exemple, dans le cas des poissons-téléostéens « Teleost fish » (Jeong *et al.*, 2008b), la présence de protéines de jonctions serrées a été déduite par microscopie électronique (EM) et établie par la perméabilité restreinte de leur BHE aux marqueurs classiques de la fonction de la barrière comme la peroxydase de raifort et le sulfosuccinimidyl-biotine, qui sont compatibles avec la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales. De plus, des marqueurs immunohistochimiques localisent des composants moléculaires spécifiques de la BHE fonctionnelle dans la microvascularisation du cerveau de poisson-zèbre, y compris les protéines de jonction serrée ZO-1 et CLDN-5 (Jeong *et al.*, 2008b).

Tableau 3-1 Liste des lignées des cellules endothéliales d'origine cérébrale décrites dans la littérature

Nom	Espèce	Méthode de transformation	Référence
BB19	Humaine	Gène E6E7 du papillome humain	(Prudhomme <i>et al.</i> , 1996)
HBEC-51	Humaine	Antigène T du SV40	(Xiao <i>et al.</i> , 1996)
SV-HCEC	Humaine	Antigène T du SV40	(Muruganandam <i>et al.</i> , 1997)
HCEC	Humaine	Antigène T du SV40	(Kannan <i>et al.</i> , 2000)
HBMEC	Humaine	Antigène T du SV40	(Stins <i>et al.</i> , 2001)
h-TERT-HBEC	Humaine	gène de la télomérase humaine	(Gu <i>et al.</i> , 2003)
IHEC	Humaine		(Sharp <i>et al.</i> , 2003)
hCMEC/D3	Humaine	gène de la télomérase humaine et Antigène T du SV40	(Weksler <i>et al.</i> , 2005)
TY08	Humaine	Antigène T du SV40	(Sano <i>et al.</i> , 2010)
ECV304	Humaine		(Yang <i>et al.</i> , 2017)
MB114	Souris	Transformation spontanée	(Hart <i>et al.</i> , 1987)
MBEC(4)	Souris	Antigène T du SV40	(Tatsuta <i>et al.</i> , 1992)
MCEC	Souris	Antigène T du SV40	(Xu <i>et al.</i> , 1992)
S5S(4)	Souris	Gène E1A de l'Adénovirus	(Wijsman & Shivers, 1998)
TM-BBB4	Souris	Antigène T du SV40	(Asaba <i>et al.</i> , 2000)
bEND.3	Souris	Antigène T du Polyomavirus	(Omidi <i>et al.</i> , 2003)
bEND.5	Souris	Antigène T du Polyomavirus	(Watanabe <i>et al.</i> , 2013)
RCE-T1	Rat	Virus du sarcome de Rous	(Mooradian & Diglio, 1991)
RBE4	Rat	Gène E1A de l'adénovirus	(Roux <i>et al.</i> , 1994)
CR-3	Rat	Antigène T du SV40	(Lechardeur & Scherman, 1995)
GP8(.3)	Rat	Antigène T du SV40	(Greenwood <i>et al.</i> , 1996)
GPNT	Rat	Antigène T du SV40	(Régina <i>et al.</i> , 1999)
RBEC1	Rat	Antigène T du SV40	(Kido <i>et al.</i> , 2000)
TR-BBB	Rat	Antigène T du SV40	(Terasaki & Hosoya, 2001)
rBCEC4	Rat	Antigène T du polyomavirus	(Blasig <i>et al.</i> , 2001)
SV-BEC	Bovine	Antigène T du SV40	(Durieu-Trautmann <i>et al.</i> , 1991)
BBEC-SV	Bovine	Antigène T du SV40	(Stins <i>et al.</i> , 1997)
t-BBEC-117	Bovine	Antigène T du SV40	(Sobue <i>et al.</i> , 1999)
PBMEC	Porcine	Antigène T du SV40	(Teifel & Friedl, 1996)

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

1. PROBLÉMATIQUE

La BHE régule de manière hautement sélective le passage des substances circulantes dans le cerveau, par laquelle l'homéostasie du SNC est conservée. Une telle barrière contrôle aussi sélectivement l'entrée des VEs.

Il a été démontré que les VEs isolées des cellules hématopoïétiques sont capables de traverser la BHE et de transférer les séquences fonctionnelles d'acide ribonucléique (ARN) du sang vers les neurones du SNC (Ridder *et al.*, 2014b; Staff, 2018). Une nouvelle preuve suggère que les VEs dérivées des globules rouges périphériques traversent la BHE dans des conditions inflammatoires médiées par l'injection périphérique de LPS (Matsumoto *et al.*, 2017a). Une étude récente a révélé que les VEs sécrétés par des cellules implantées par voie sous-cutanée chez la souris sont passés dans la circulation sanguine et traversent la BHE délivrer l'ARNm dans le cerveau (Kojima *et al.*, 2018b). Cependant, la possibilité que les VEs totales du plasma humain en circulation traversent la BHE n'est encore connue. En effet, notre défi actuel est de savoir si les VEs totales plasmatiques peuvent traverser ou non la BHE.

2. HYPOTHÈSE

L'hypothèse de ce projet est que les VEs plasmatiques humaines sont capables de franchir la BHE.

3. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Objectif 1 :

Isolation, analyse et marquage des VEs. Les caractérisations se déroulent en quatre étapes, soient la microscopie électronique pour la morphologie, les "Western blots" pour la présence de marqueurs vésiculaires et la technique d'analyse de suivi des NPs pour la détermination de leurs concentrations et de leurs tailles. Dans la deuxième partie, nous avons mis au point un protocole de marquage des VEs avec un fluorophore spécifique des bicouches phospholipidiques. L'efficacité du marquage a été vérifiée par microscopie confocale, NTA et par cytométrie en flux.

Objectif 2 :

Développer un modèle *in vitro* de la BHE basé sur les cellules vasculaires endothéliales murines bEnd.3. Ce modèle permet d'étudier l'internalisation des VEs fluorescentes et d'évaluer l'efficacité de leurs passages à travers cette barrière.

Objectif 3 :

Injection des VEs marquées dans la circulation de larves de Zebrafish afin d'évaluer leur biodistribution.

3

SECTION 2 : ARTICLE

Titre de l'article en anglais: **Endocytosis and transcytosis of the total human peripheral extracellular vesicles across an *in vitro* blood brain barrier model and *in vivo* cerebral distribution**

Titre de l'article en français: Endocytose et transcytose des vésicules extracellulaires périphériques totales humaines à travers un modèle de barrière hématoencéphalique *in vitro* et la distribution cérébrale *in vivo*

Sarra Landri ¹, Jean-Michel Rabanel ¹, Mohamed Haddad ¹, Mohamed Ben Kheder.¹, Charles Ramassamy ^{1,*}

¹ INRS, centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 525, boulevard des Prairies, Laval QC Canada

* Corresponding author: charles.ramassamy@iaf.inrs.ca / Phone : (450) 687-5010 x8839

Laboratoire de recherche de neuropharmacologie et toxicologie du stress cellulaire

Revue : Journal of Cellular and Molecular Life Sciences

Contribution des auteurs de l'article

Contribution personnelle

Dans le but de produire un article de qualité élevée et qui représente le livrable de mes travaux dans le cadre de maîtrise en science expérimentale de la santé, j'ai coordonné, documenté et réalisé toutes les expérimentations nécessaires et utilisées pour argumenter le présent article.

D'abord, j'ai isolé les vésicules extracellulaires (VEs) à partir du plasma humain; j'ai élaboré et optimisé un protocole de marquage des VEs à la PKH67.

Ensuite, j'ai analysé et caractérisé les VEs avant et après leurs marquages, en utilisant différentes techniques telles que la microscopie électronique à transmission (MET), Western Blot, j'ai analysé les VEs, pour la première fois dans notre laboratoire, dans le CytoFlex et sur NTA NS300 en développant moi-même un nouveau protocole d'analyse des VEs fluorescentes.

Par ailleurs, j'ai également établi un modèle de monocouche de cellules bEnd3. Et pour y parvenir, j'ai suivi la résistance électrique transendothéliale (TEER) de ces cellules. Ensuite, j'ai suivi l'expression des protéines de jonction serrées par Western blot et leur localisation en immunofluorescence. Puis j'ai traité les images prises par microscopie confocale sur le logiciel ZEN 2.6 (blue edition).

Enfin, non seulement, j'ai étudié l'internalisation des VEs-PKH67 par les cellules bEnd3 en immunofluorescence et par CytoFlex, mais aussi, j'ai étudié l'efficacité de passage des VEs à travers le modèle établi sur cytoflex. Aussi, j'ai confirmé l'étude en effectuant les analyses statistiques sur GraphPad Prism 6.

Finalement, pour synthétiser et représenter les résultats des expérimentations sous forme de contenu structuré et des figures, j'ai utilisé les outils tels que PowerPoint, ImageJ, Fiji et Zen 2.6. Ainsi, j'ai rédigé spécifiquement le manuscrit pour les sections du titre, résumé, matériel et méthode, discussion et conclusion.

Contribution des coauteurs :

- Jean-Michel Rabanel : il a passé les échantillons de VEs-PKH67 dans CytoFlex. il a injecté les VEs fluorescentes dans les larves de poissons-zèbres et il a analysé les larves de poisson-zèbre par microscope confocale. Ainsi, il a contribué à la rédaction de toute la partie sur le modèle de larve poissons-zèbre.
- Mohamed Haddad : il a participé à la rédaction du manuscrit pour la partie introduction de l'article
- Mohamed Râafet Ben Kheder : la réalisation de la partie western blot pour la protéine TSG101. Aussi, il a contribué à la rédaction de la partie résultat de l'article.

Résumé de l'article en français

Récemment, il a été démontré que les vésicules dérivées des cellules, les vésicules extracellulaires (VEs), en particulier les exosomes, jouent un rôle clé dans le cerveau grâce à leurs fonctions de communication et de signalisation intercellulaire. Ils ont été suggérés pour transporter des protéines, des lipides ou des acides nucléiques entre le sang et le cerveau dans les deux sens. Cependant, la perméabilité des vésicules dérivées des cellules à travers la barrière hématoencéphalique (BHE) n'est pas encore claire. Nos objectifs étaient de démontrer que les VEs périphériques humaines de sujets sains sont capables de traverser les cellules endothéliales b.End3, un modèle *in vitro* de la BHE. Pour cela, nous avons isolé des VEs de plasma humain sain, caractérisé leur morphologie par microscopie électronique à transmission, déterminé leur taille par analyse de suivi des nanoparticules (NTA) et mis en évidence la présence de deux marqueurs des VEs, TSG101 et CD63. Par la suite, les VEs ont été marquées avec le fluorophore PKH67. Leur endocytose et leur transcytose ont été suivies sur un modèle insert, un modèle de BHE *in vitro* basé sur les cellules vasculaires endothéliales murines largement caractérisées b.End3. Nous avons constaté que les VEs plasmatiques humaines totales étaient efficacement internalisées et libérées par les cellules b.End3 dans le compartiment basal du système d'insert. La stabilité des VEs marquées à la PKH67 a été contrôlée par immunocoloration de la PKH67 avec le TSG101. Enfin, les VEs humaines totales ont été injectées dans le compartiment vasculaire de la larve de poisson-zèbre de 48 hpf, pour évaluer leur biodistribution et leur capacité à traverser la BHE. Fait intéressant, les VEs étiquetées ont été trouvées dans le cerveau 24 heures après l'injection. En somme, ces résultats ont démontré que les VEs périphériques humaines étaient capables de franchir le modèle de la BHE *in vitro* et *in vivo* dans les larves du poisson-zèbre de 48 hpf.

Mots clés: vésicules extracellulaires, exosomes, cellules endothéliales cérébrales murines, bEnd.3, barrière hématoencéphalique, PKH67, poisson-zèbre

Version originale de l'article

ABSTRACT:

Recently, cell-derived vesicles, extracellular vesicles (EVs) particularly exosomes, have been demonstrated to play a key role in the brain through their intercellular communication and signaling functions. They have been suggested to transport proteins, lipids or nucleic acids between the blood and the brain in both directions. However, the permeability of cell-derived vesicles across the blood-brain barrier (BBB) remains unclear. Our objectives were to demonstrate that the human peripheral EVs from healthy subjects are able to cross the endothelial cells bEnd.3 cells, an *in vitro* model of the BBB. For this, we have isolated Evs from plasma healthy human, characterized their morphology by transmission electronic microscopy, determined their sizes by Nanoparticle Tracking Analysis and evidenced in the presence of two EVs markers, TSG 101 and CD63. EVs were then labelled with a fluorophore dye PKH67. Their endocytosis and transcytosis were followed by a Transwell® model, an *in vitro* BBB model based on widely characterized murine endothelial vascular cells bEnd.3. We found that total human plasma EVs were efficiently internalized and released by bEnd.3 cells in the basal compartment in the transwell system. The stability of the PKH67-labelled EVs was monitored by the immunostaining of the PKH67-EVs with TSG101. Finally, total human EVs were injected into the vascular compartment of 48hpf zebrafish larvae, to assess their biodistribution and their capacity to cross the BBB. Interestingly, labelled- EVs-were found in the brain 24 hours after the injection. Together, these results demonstrated that the human peripheral EVs were able to cross the *in vitro* model of the BBB and *in vivo* in the 48hpf zebrafish larvae.

Keywords: Extracellular vesicles, Exosomes, mouse brain endothelial cells, bEnd.3, Blood-brain barrier, PKH67, Zebrafish

1. INTRODUCTION

The extracellular vesicles (EVs) are nano membrane-bound carriers which are released by all cell types (Maas *et al.*, 2017). These vesicles are referred to by a variety of names and are formed through multiple pathways. The first group of EVs is called exosomes. These vesicles are released through multivesicular bodies in the endosomal pathway. The second group is one called microvesicles which are formed by budding from the plasma membrane (Kowal *et al.*, 2016a). Regardless of their origin, EVs are implicated in intercellular communication through their ability to transfer a variety of biological cargos, including proteins, lipids and nucleic acids (Record *et al.*, 2014). EVs have the capacity to protect their biological content from degradation and the potential to deliver it to recipient cells by fusion with the plasma membrane or via endocytosis mechanisms (Mulcahy *et al.*, 2014). Moreover, one important parameter regarding the physiology of EVs is their potential ability to cross tissue barriers (Jarmalaviciute & Pivoriunas, 2016). This could have implication in normal physiology of brain-periphery communication, central nervous system (CNS) disease pathophysiology and may provide a new avenue for brain drug delivery.

The most selective tissue barrier is the blood-brain barrier (BBB) which is composed of endothelial cells held together by tight and adherence junctions associated with a discontinuous layer of pericytes. The BBB is a vital boundary between neural tissue and circulating blood which plays a protective role to insure brain homeostasis (Cipolla, 2009). The BBB ensures the selective passage of molecules and particles to the brain. The passage through endothelial cells is called transcellular transport and is mediated by different pathways including passive diffusion of lipophilic molecules, active transport and receptor-mediated transcytosis (Abbott *et al.*, 2010b; Choi & Kim, 2008; Saraiva *et al.*, 2016). Although the evidence is still limited, studies have suggested that EVs may move from the peripheral circulation to the central nervous system (CNS).

In mice, a recent study showed that peripheral red blood cell-derived EVs cross the BBB under inflammatory condition. EVs were assumed to cross the BBB via transcellular transport mediated transcytosis and co-localize with microglia cells in the brain (Matsumoto *et al.*, 2017b).

Like wise from hematopoietic cells were demonstrated to cross the BBB transporting functional ribonucleic acid sequences (RNA) from blood to neurons (Ridder *et al.*, 2014a). In mice, intravenous injection of dendritic cells-derived EVs expressing neuronal targeting peptide delivered small interfering RNA (siRNA) specific to BACE1, an enzyme implicated in A β production, resulting in a specific gene knockdown in the brain (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011a). In agreement with this study, systemic EVs siRNA delivery was demonstrated to reduce α -synuclein aggregates in the brain of transgenic mice (Cooper *et al.*, 2014). More recently, EVs secreted by cells implanted subcutaneously in mice were shown to distribute into the blood circulation and cross the BBB to deliver mRNA in the brain. (Kojima *et al.*, 2018a).

Despite these findings, little attention has been paid to the total human circulating EVs and their involvement in the periphery to brain communication. Further, the possibility of the total circulating human EVs to cross the BBB is still not known. In the present study, we isolated and characterized EVs from human plasma and examine their transport across an *in vitro* model of BBB and *in vivo* in zebrafish larvae. Our results support the passage of intact peripheral EVs across the BBB, both *in vitro* and *in vivo*.

2. MATERIALS AND METHODS

1. Isolation, labelling and characterization of extracellular vesicles

1.1. Isolation of EVs :

Plasma samples were obtained from healthy subjects. In order to isolate EVs, the human plasma samples underwent a clarification step by centrifugation at 10,000 g for 20 min. The Total Exosome Isolation Reagent "ExoQuick" (Invitrogen™ by Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) was added to the debris-free plasma samples and kept for 30 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 10,000 g for 5 min. The resulting pellets were washed, filtrated and resuspended on PBS. EVs pellets were stored at –80°C until further uses. EVs were lysed and the proteins were extracted using "Radio Immuno Precipitation Assay" (RIPA) lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors cocktails (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit", Thermofisher scientific, Meridian, Rockford, USA). The optical density (OD) was read at 562 nm using Synergy™ HT (BioTek instruments, Inc. Winooski, VT, USA).

1.2. Labelling of EVs

100 µg of fresh EVs were labelled with the PKH67 dye (PKH67 GL-1KT, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Briefly, EVs were dissolved in 250 µl of dilution media and mixed with PKH67 dye also diluted in 250 µl of the same media, gently mixed for 10 minutes at room temperature. Staining was stopped by adding ¼ (v/v) of exosomes depleted fetal bovine serum (ED-FBS) (Life Technologies Corporation Grand Island, NY, USA) for 1 min. EVs were

filtered on 100 kDa molecular weight filter (Millipore sigma, Oakville, Ontario, CA) and centrifuged at 3000 g for 15 minutes at 4°C. EVs pellets were washed with 1X PBS to remove PKH67 excess and debris. The supernatant was collected, aliquoted and kept at -20°C until use.

To confirm the specificity of EVs labelling, these last were further stained with the rabbit anti-TSG101 (Tumour Susceptibility Gene 101) (MyBiosource, Inc. San Diego, CA, USA) at the dilution ratio of 1:50 for 1 hour at room temperature. EVs were then incubated with the anti-rabbit antibodies labelled with Alexa Fluor 594 nm (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) at dilution ratio of 1:500 for 1 hour at room temperature. In order to remove free and excess antibodies, EVs-PKH67-TSG101 were filtered on 100 kDa molecular weight filter (Millipore sigma, Oakville, Ontario, CA) and centrifuge at 3000 g for 15 minutes at 4°C, then the pellet was washed 2 times with 3 mL of 1X filtered PBS. The supernatant was collected and stocked at -20°C until use.

1.3. EVs characterization methods

1.3.1. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Briefly, fresh isolated EVs from human plasma were diluted in PBS and 4% paraformaldehyde. Subsequently, 10 µl of the sample were placed on a copper grid covered by FORMVAR (plastic support film) for 15 min and dried with blotting paper. The sample was negatively stained by adding a drop of 2% uranyl acetate for 1 min. The grid was viewed using a Transmission Electron Microscope (Hitachi H7100, Japan) and the images were captured using a digital camera (AMT XR111).

1.3.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

The NTA NS300 (Nanosight, Malvern panalytical. UK) was used to determine the concentration (number of EVs/mL) and sizes (nm) of EVs . EVs samples were diluted 1000 times in water in order to avoid pixel saturation during acquisition. The NTA instrument was connected to illuminated laser (488 nm), a wavelength used to excite PKH67 green fluorophore bound to EVs membrane. Three 60 sec videos for each of EVs fraction were recorded with a high-resolution camera, then all the fractions were analyzed using the same detection threshold. The analysis was carried out with NTA 3.4 software.

1.3.3. Western Blot of EVs Protein Markers

The total EVs protein samples to be analyzed were heated for 5 min at 95 °C in a denaturing buffer containing β -mercaptoethanol and SDS (sodium dodecyl sulfate), and proteins were loaded on 10% of polyacrylamide gel electrophoresis. The total proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. After transfers, membranes were washed with PBS 1X once for 30 min and blocked with 5% skim milk for 1h, in TBS (Tris-buffered saline). They were then incubated with the primary antibodies TSG 101 (1: 2500) (MyBiosource, Inc. San Diego, CA, USA) or calnexin (1: 500) (Santa Cruz Biotechnology. Dallas, Texas, USA) or CD63 (1: 500) (Santa Cruz, Inc. Dallas, Texas, USA) overnight at 4°C. Then membranes were washed 30 min, 3 times with TBS-Tween 0,1% at room temperature and incubated with secondary antibodies labelled with HRP anti-rabbit antibodies (1: 5000) (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) and anti-mouse antibody (1:1000) (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) for 1 hour. After 3 times TBS-Tween 0,1% washes of 30 min the proteins were detected by

chemiluminescence (Alpha Innotech, MA, USA). The membranes were incubated for 2 min with HRP substrate (ECL; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The membrane blots were detected by chemiluminescence using ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and the FluorChem HD2 system. The membrane was stained with Coomassie blue to detect the profile of EVs total proteins.

1.3.4. Analyses of Extracellular Vesicles by Nanoscale Flux Cytometry

Analysis of EVs by flux cytometry was performed using CytoFlex S (Beckman Coulter, Pasadena, CA) equipped with four lasers (405, 488, 640 and 561 nm wavelength). The detection of EVs was performed with violet side scattering (V-SSC) using the 405 nm violet laser. The detection threshold for V-SSC was set in 1800 with a gain of 200. The fluorescent detection of the green fluorochromes PKH67 positive vesicles was performed with the FITC channel (488 nm laser), with gain set in 2000. Samples were run with a slow flow rate (10 μ L/min) for 2 min until the event/s rate was stable and abort rates had decreased below 2%. The acquisition time was set at 30 sec unless otherwise indicated in the results section. Data were acquired and analyzed using CytExpert 2.0 software (Beckman Coulter Pasadena, CA). Gated regions were determined to use unstained EVs as controls. Relative diameters of EVs were determined by NIST PS non fluorescent beads.

1.3.5. Confocal Analysis

After EVs labelling, either by PKH67 fluorophore or TSG101 antibody or both PKH67 and TSG101. 40 μ g of the drop sample was placed on a glass slide. The EVs drop were mounted using

Prolong™ Gold antifade reagent (Invitrogen by thermofisher scientific, MA, USA), after polymerization of the mounting solution they were imaged using LSM 780 scanning confocal microscope (Zeiss, Canada). A plan-Apochromat 63x/1.4 objective. To ensure that the lights observed by confocal microscopy really comes from EVs. Several checks have been made on the analysis of just PKH67 fluorophore, or EVs labelled only with TSG101 antibodies, or EVs labelled with anti-Rabbit antibodies coupled to Alexa 594 nm.

2. Construction of bEnd.3 Monolayer Model

The immortalized mouse brain endothelial cells, bEnd.3 were obtained from ATCC (ATCC CRL-2299TM). The bEnd.3 passages number in this study were from 16 to 21. 3×10^4 cells/cm² were plated on Transwell® (Life Sciences, Durham, NC, USA) 0.3 cm² membrane filters with 0.4 µm porosity, cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% calf serum fetal (FBS) and 1% antibiotic. The culture medium was changed every other day. The cells grew as a monolayer confluence within 7 days of seeding.

After 7 days of culture, the cell monolayer permeability was assessed by transendothelial electrical resistance (TEER) measurements using Epithelial Volt/Ohm Metre (EVOM2, World Precision Instruments Inc.) equipped with a cell culture cup chamber electrode (Endohm-6, World Precision Instruments Inc. USA). The background value measured on the cell-free insert was subtracted from the total TEER measurement.

Cells with TEER value higher than 35 Ω.cm² were selected for the transcytosis studies. The calculation of resistivity (Ohms.cm²) was as follows:

$$TEER = (Resistance (\Omega) - Insert Resistance (\Omega)) \times Surface area (cm^2)$$

Immunofluorescence of tight junction proteins were conducted on bEnd.3 monolayers either grows on a glass slide (for control and tuning of detection conditions) or on Transwell® insert. Briefly, for Transwell® experiments, at the confluence (with TEER above $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ and P_{app} of Dex-FTIC below $2 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), the bEnd.3 cells monolayer was fixed with PFA 4% on PBS. Cells were permeabilized with 0.25% vol./vol. Triton in PBS containing $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) for 10 min. After washing with PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, cells were incubated for 1 hour in a blocking solution composed of 0.25% Tween 20 in PBS (PBST) with 5% BSA (w/vol). Then cells were incubated at room temperature under shaking with the primary antibodies ZO-1 (dilution between 1:200 and 1:500) or Claudin-5 (dilution between 1:200 and 1:500). After 2 hours, primary antibodies were removed and cells were washed with PBST followed an incubation with the secondary antibodies (1:500), at room temperature. After by 1 hr, cells were washed with PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and stained with Hoechst 33342 (1:10 000) in the blocking buffer for 10 minutes. The central parts of the insert were cut out with a scalpel and mounted on glass slide using prolong® Antifade mounting medium (ThermoFisher scientific, Canada).

Mounted inserts or cells grown on glass cover slips were examined on a Zeiss LSM780 system confocal microscope (Zeiss, Germany) equipped with a 30 mW 405 nm diode laser, a 25 mW 458/488/514 argon multiline laser, a 20 mW DPSS 561 nm laser and a 5 mW HeNe 633 nm laser mounted on Zeiss Axio Observer Z1. The acquisitions were operated with Zen® 2011 software (Zeiss, Germany). We use a Plan-Apochromat 63x oil DIC 1.4NA objective for our observation and a 1.6x zoom scan. Images were analyzed with Zen® Blue Black (Zeiss, Germany) or ImageJ software (Kurachi *et al.*, 2016).

The permeability of the monolayer bEnd.3 cells on transwell® was also assessed with Dextran-FITC (10kD, Sigma-Aldrich, Canada). Briefly, 10 μl of 1 mg/mL solutions of 10kD Dex-FITC in

serum-free without phenol red culture media were added to the apical side of the insert. After 1 hr incubation time, 150µl was sampled from the basal compartment and analyzed on a 96-wells plate (Tecan, Switzerland). Apparent permeability index (P_{app}) was calculated from the following equation:

$$P_{app} = \frac{V_R \Delta C_R}{\Delta t S_{ins} C_D}$$

With P_{app} apparent permeability ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$); V_R , volume of receiving compartments (cm^3), ΔC_R , change in concentration in the receiving compartment (μM); Δt , time in seconds (s); S_{ins} : surface of the insert (cm^2) and C_D : concentration in the donor compartment (μM).

Monolayers of bEnd.3 at 10 , 50 and 100% confluences were collected to follow the expression of tight junction proteins as a function of time. The cells were lysed, and protein aliquots of crude extract were separated on a 10% polyacrylamide gel, followed by a transfer to PVDF membranes by transfer cassettes of Trans Blot Turbo Biorad system. The membrane was blocked for 1h in 5% TBS-milk and then incubated in primary antibodies: ZO-1 (zonula occludin-1) (ThermoFisher scientific, Cambridge, MA, USA) at dilution ratio 1: 200 or Cld-5 (Claudin 5) (ThermoFisher scientific, Cambridge, MA, USA) at dilution ratio 1:300 or occludin (ThermoFisher scientific, Cambridge, MA, USA) at dilution ratio 1:50 overnight at 4 °C. The following day the membrane was incubated with the secondary antibody HRP-coupled anti rabbit antibody (Cell Signalling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) at dilution ratio 1:500 or HRP-coupled anti-mouse antibodies (Cell Signalling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) at dilution ratio 1:500 for 1h at room temperature. Proteins bands detection was performed using ECL substrate. The relative amounts of immunoreactive protein were visualized using the luminescent (Alpha Innotech, MA, USA) FluorChem HD2 Gel Imaging System.

3. In vitro Confocal Fluorescent Imaging for EVs Uptake by bEnd.3

3.1 Endocytosis of EVs by bEnd3

The bEnd.3 were grown on the Transwell® (Life Sciences, Durham, NC, USA) with 0.4 µm pore size as described above. In order to image the time course of EVs uptake in bEnd.3, PKH67-labeled EVs (40 µg) or PBS without PKH67 were then added to bEnd.3 and incubated for 4 hours or 24 hours at 37 °C. All cells were then fixed with 4% PFA and nuclei were counter stained with Hoechst 33258 (Aldrich Chem.Co) at 1:1000 for 10 min. Image analysis was performed using a Zeiss LSM 780 Multiphoton/Confocal microscope (Zeiss). The middle Z plane of the cells was imaged to ensure the best imaging position. All the images were analyzed with Zen 2.6 software (blue edition).

To confirm that the fluorescence of PKH67 corresponds to EVs, the EVs-PKH67 were labelled with the primary antibody TSG101 (1:50) for 1 hour at room temperature and then incubated with the anti-rabbit secondary antibody (1:500) for 1 hour at room temperature. The sample was washed 3 times with filtered PBS 1X.

For the endocytosis experiments, the bEnd.3 were grown on Transwell® with 0.4 µm pore size, until confluence. Cells then were incubated with 40 µg of the double labelled EVs-PKH67-TSG101 for 4 hours or 24 hours. After incubation, excessive EVs were washed three times with PBS. Cells were fixed with 4% PFA and nuclei were counter stained with Hoechst 33258 (Aldrich Chem.Co. Toronto, ON, CA). A confocal (Zeiss 63x 1.4 NA) objective was used to localize EVs and the images were analyzed with the Zen 20.6 software. The double staining of EVs with PKH67 dye and TSG101 antibodies was indicated as yellow (green and red) pixels in the overlay images.

3.2 Transcytosis Studies

For the transcytosis studies through the bEnd.3 monolayer cultured on the Transwell®, cells labelled EVs were added in the apical compartment for 4 or 24 hours. Conditioned medium from the apical and basal chambers were collected for Cyto-Flex analysis as described above.

4. In Vivo Distribution of Zebrafish Larvae and Cerebral Distribution of EVs

Wild-type zebrafish, Tupfel long-fin (TL) strain (*Danio rerio*) was maintained at 28°C and kept under a 12/12 h light/dark cycles at the animal facility of the Centre National de Biologie Experimental (CNBE, Laval, Canada). Pigment formation was blocked by adding 0.003% phenylthiourea (PTU) dissolved in egg water at 24 hours after fertilization (hpf).. 48hpf larvae were immobilized in low melting point agarose (UltraPure™LMP Agarose, InVitrogen, Life Technologies, Canada) in 35 mm Glass bottom Petri dishes (MatTek Corporation, MA, USA). Larvae were injected in the duct of Cuvier using micropipette (10 cm Borosilicate Glass Micropipette with filaments, Sutter Instrument, USA) pulled on a flaming/Brown Micropipette Puller Model P97 (Sutter Instrument, USA). Volumes of injections were controlled by the measurement of droplet size in mineral oil. The micropipette was controlled with a manual micromanipulator MN-153 (Narishige). The injection volumes were controlled with a nanoinjector FemtoJet 4 I (Eppendorf, USA). Confocal imaging was performed on a LSM780 confocal microscope (Zeiss, Germany). The dose of EVs injected was 4.55 µg/µl (protein content) for a total volume of about 5 nL. Only larvae maintaining heartbeat and robust circulation throughout the imaging period were reported.

5. Statistical Analysis

All data are presented as average \pm SEM. For statistical evaluation, the value was compared using ANOVA unidirectional variance analyzes or paired t-test using GraphPad Prism 6.0. In this study, the probability value (p-value) $< 0,05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

Characterization and labelling of EVs

The morphology of EVs was confirmed by TEM (Fig. 4.1a). The size distribution of EVs, as demonstrated by NTA data and cytometry data, showed a heterogeneous population of particles with sizes ranging from 50 to 300 nm (Fig. 4.1b,c). The western blot analysis revealed the presence of EVs specific protein such as TSG101 and CD63 (Fig. 4.1d). The non-detected of calnexin indicates the absence of contamination of EVs by other cell compartments (Fig. 4.1d).

EVs with superior size range (80-150 nm) were stained more efficiently by the lipophilic fluorescent dye PKH67 compared to the other EVs sub-populations (Fig. 4.2a). Compared to NTA instruments, cytoflex allowed a more sensitive detection of labelled EVs fluorescence (Fig. 4.2b). According to our data, the CytoFlex enabled the detection of 43,8% of fluorescence from the studies, whereas NTA couldn't detect more than 10% of the labeled vesicles. EVs were successfully double-stained with PKH67 and TSG101 as shown by confocal microscopy (Fig. 4.2c-g). TSG101 is an ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) protein associated with typical exosomal protein ALIX that participate in endosomal membrane abscission and budding, as well as exosomal cargo sorting via specific interactions. Our results support the use of TSG101 as a reliable marker for EVs labelling in fluorescence-based detection methods.

Characterization of an Endothelial Monolayer Model of BBB

The expression of tight junction proteins (occludin, claudin-5 and ZO-1) in bEnd.3 cells was measured by Western Blot analysis for 7 days post-cell seeding (Fig. 4.3a). The tight junction

proteins reached the highest expression starting from the day 3 (**Fig. 4.3b**). Moreover, the paracellular barrier function was evaluated by TEER measurements. The best integrity of tight junction dynamic was observed by day 7 (TEER above $34 \Omega \text{ cm}^2$) and support the data obtained from western blot analysis (**Fig. 4.3c**). Furthermore, images from confocal microscope gave an additional proof of the high expression levels and efficient distribution of tight junction proteins (**Fig. 4.3d-h**).

Evidence of EVs Uptake by bEnd.3 Cells

EVs uptake by vascular endothelial cells was monitored by microscopy and FACS analysis. As shown in **Fig. 4.4a-i**, cell uptake of PKH67-labeled EVs increase with time and was higher at 24 h post-incubation compared to 0 h and 4 h. The data were quantitatively confirmed by cytometry analysis that shows a maximum internalization of particles in up to 96.7% of the cell by 24 h (**Fig. 4.4k-l**).

The same result was reported concerning double labelled EVs (PKH67 and TSG101) according to a 24 h kinetics as demonstrated by fluorescent microscopy (**Fig. 4.5 a-l**).

Translocation of EVs across the *in vitro* BBB model

The translocation of EVs across bEnd.3 monolayers was investigated next using cytometry analysis to detect EVs in biological media. Cytometry analysis showed that 60% of fluorescently labelled EVs can cross through recipient cells to reach the basolateral compartment at 24 h post-incubation (**Fig. 4.6a-e**). The increase in PKH67-labelled EVs number in the basal (receiving) compartment is matched with a decrease of EVs numbers in the apical (donor) compartment. Our

results clearly indicate that EVs are effectively taken up by bEnd.3 cells and then released into the opposite compartment.

Human EVs Biodistribution Plasma in Zebrafish Larvae Blood Circulation

Injections of human plasma EVs labelled with PKH67 in 48hpf zebrafish larvae show a distribution of fluorescence restricted to the vascular compartment at 2-hour post-injection (**Fig. 4.7b**). At 24-hour post-injection an overall decrease of fluorescent signals in the larvae is detected (**Fig. 4.7c**). Fluorescent signal is more distributed in tissue particularly in the caudal vein plexus (CVP) region (**Fig. 4.7**). Extravascular fluorescence is also recorded in the brain supporting the notion of EVs translocation across the BBB (**Fig. 4.7d**). However, the injection of PKH67 green fluorescent dye without EVs, shows no signal (**Fig.4.7a**). Which confirms that the fluorescence observed in zebrafish larvae comes from EVs.

In a separate experiment, EVs were co-injected along with Cy5-Fluorescent PEGylated NPs as a biodistribution control (see Table S1 for NP properties). These 140 nm NPs are confined to the vascular compartment during the time frame of the experiment (unpublished data). At 2-hour post-injection, confocal images revealed a perfect overlay of PEGylated Cy5-NP signal (white) with EV PKH67 signal (green), in vascular compartment including the CVP area (**Fig. 4.8**).

Likewise free Dextran-FITC (10kDa) was injected as a small fluorophore control. Fluorescence diffusion out of the circulation networks is revealed in different extravascular compartments including fins and brain structures at 2 and 24-hour post-injection (**Fig. 4.9**).

4. TABLE AND FIGURES

Table S1. Characteristics of Cy5 fluorescent PEGylated NPs.

Note: DLS: Dynamic Light Scattering, NTA: Nanoparticle Tracking Analysis, PDI: Polydispersity Index; SD: standard deviation

Nanoparticle	DLS measurements		NTA measurements			Zeta potential	
	z-average <i>d.nm</i>	PDI	Mean <i>d.nm</i>	Mode <i>d.nm</i>	SD <i>+/- nm</i>	ζ <i>mV</i>	SD $\pm mV$
NPs-2000-10-140	141.1	0.135	123.4	91.2	44.6	-3.9	3.9

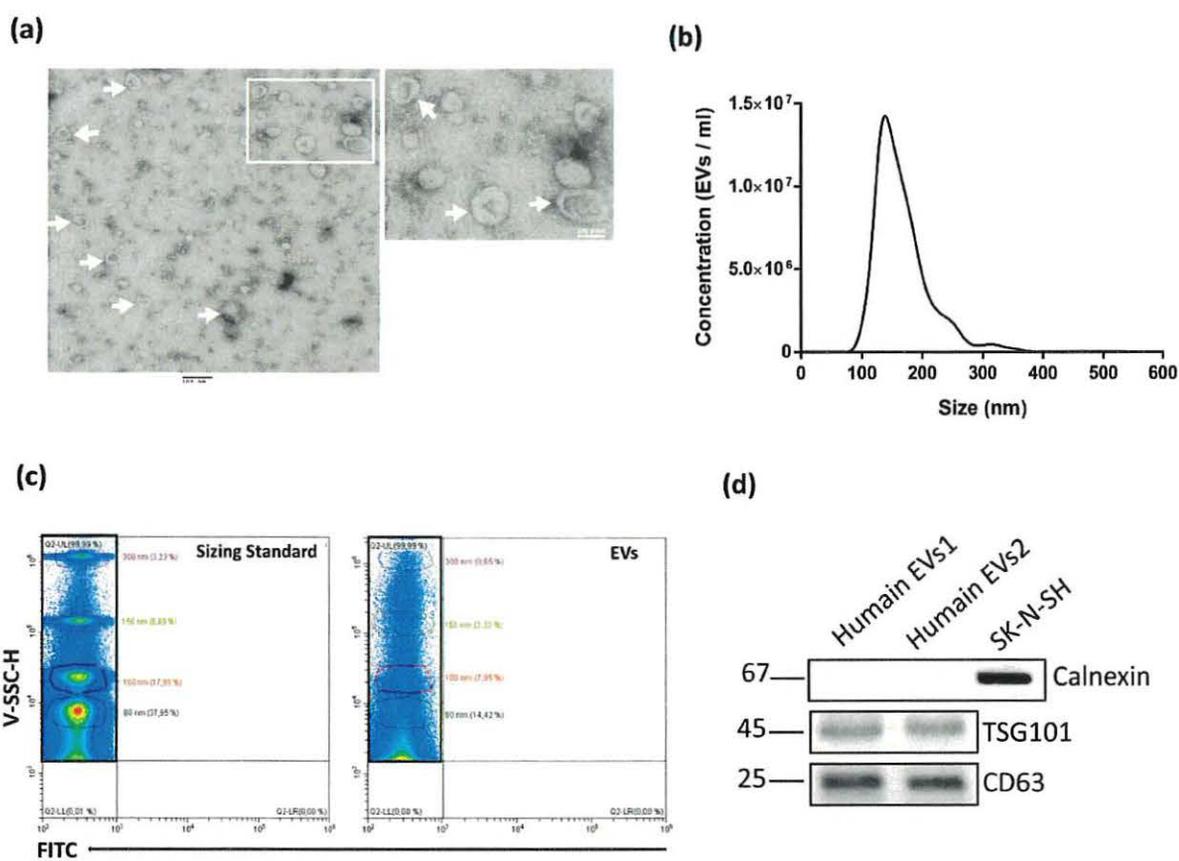


Fig. 4.1. Characterization of the human plasma EVs. (a) Representative TEM image of human plasma EVs (scale bar: 100 nm) at 20,000 x magnification. (b) Size distribution and particle concentration of total human plasma EVs as determined by Nanoparticle Tracking Analysis (Nanosight NS300, Malvern, UK). The figure shows the concentration of EVs after 1: 1000 dilution. (c) Size distribution was confirmed by cytometry using the violet side scattering channel (CytoFlex S Beckman, USA) of a standard size marker (left) and total EVs preparation (right). (d) Western Blot results depicts the expression of different exosomal markers (TSG101, CD63) in EVs and the expression of integral protein of the endoplasmic reticulum (Calnexin) in SK-N-SH neuronal cells as negative control. According to EVs concentration determined by NTA and protein dosage by BSA, an equivalent amount of EVs was loaded on the gel.

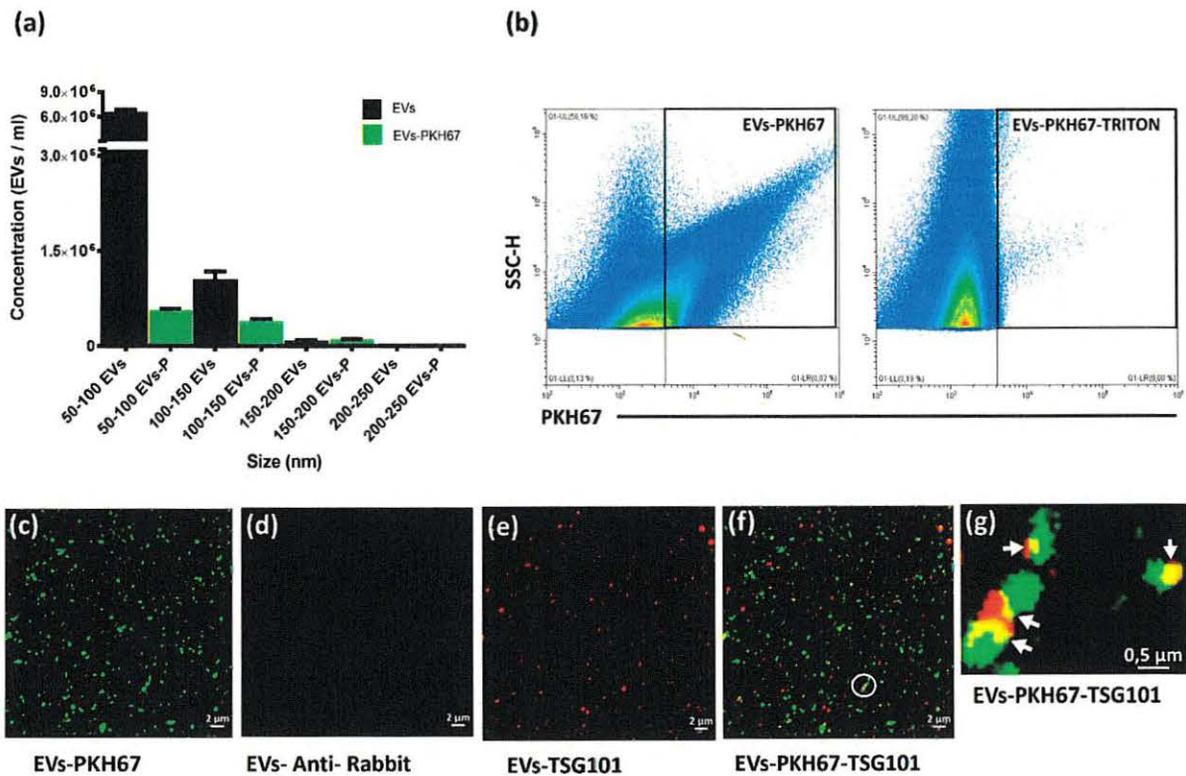


Fig. 4.2. Characterization of human plasma EVs after labelling with PKH67 lipophilic dye. (a) Total EVs size distribution with and without PKH67 labelling (excitation of 490 nm and emission 502 nm), after 1:100 dilution. (b) PKH67 labelled EVs were analyzed by CytoFlex. Triton 0,2% was added to solubilize lipidic vesicles (c) EVs labelled with PKH67; (d) EVs immunolabeled with TSG101 bound to anti-rabbit Alexa Fluor 592 nm. (e) The EVs labelled with the secondary anti-rabbit antibody (negative control), scale bar is 2 μ m; (f) The image represents the overlay of the fluorescence from EVs labelled with both PKH67 and TSG101 antibody; (g) The image shows an enlarged zone of (F), the scale bar is 0.5 μ m.

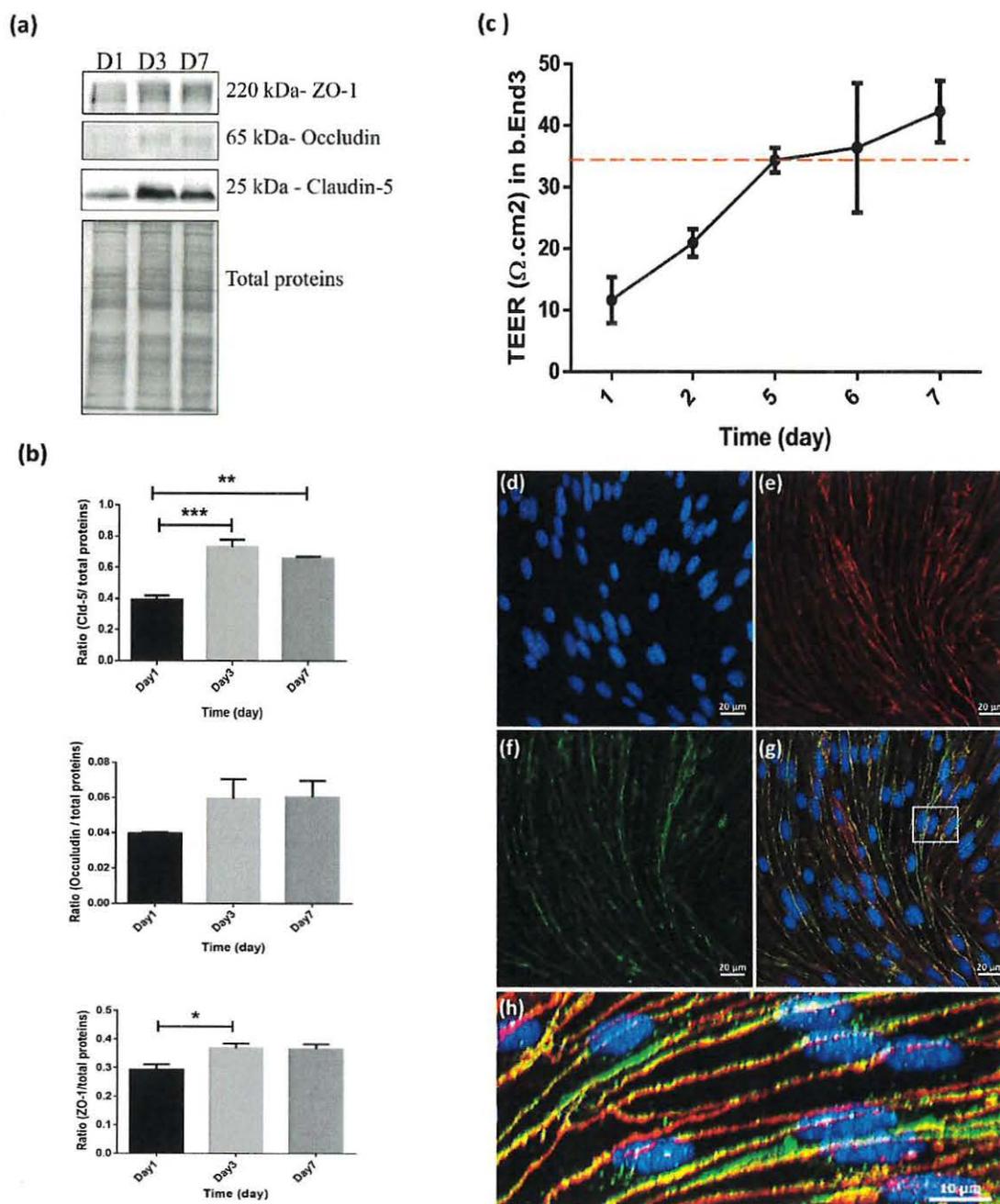


Fig. 4.3. Characterization of the bEnd.3 monolayer. (a) Monitoring the expression of the tight junction proteins (ZO-1, occludin and claudin-5) at day1, day3 and day7 after seeding. (b) Statistical analysis of the WB results (N=3 of the same sample). (c) TEER measurements (d-g) Confocal images showing the localization of tight junction proteins in bEnd3 monolayer. (d) Nuclei stained with Hoechst (blue), (e) ZO-1 antibodies (red), (f) Claudin-5 antibodies (green) and (g) Merge d-e-f. The bar scale is 20 μm . (h) 3 dimensions of enlarge section of the figure g showing junction protein localization (scale bar is 10 μm).

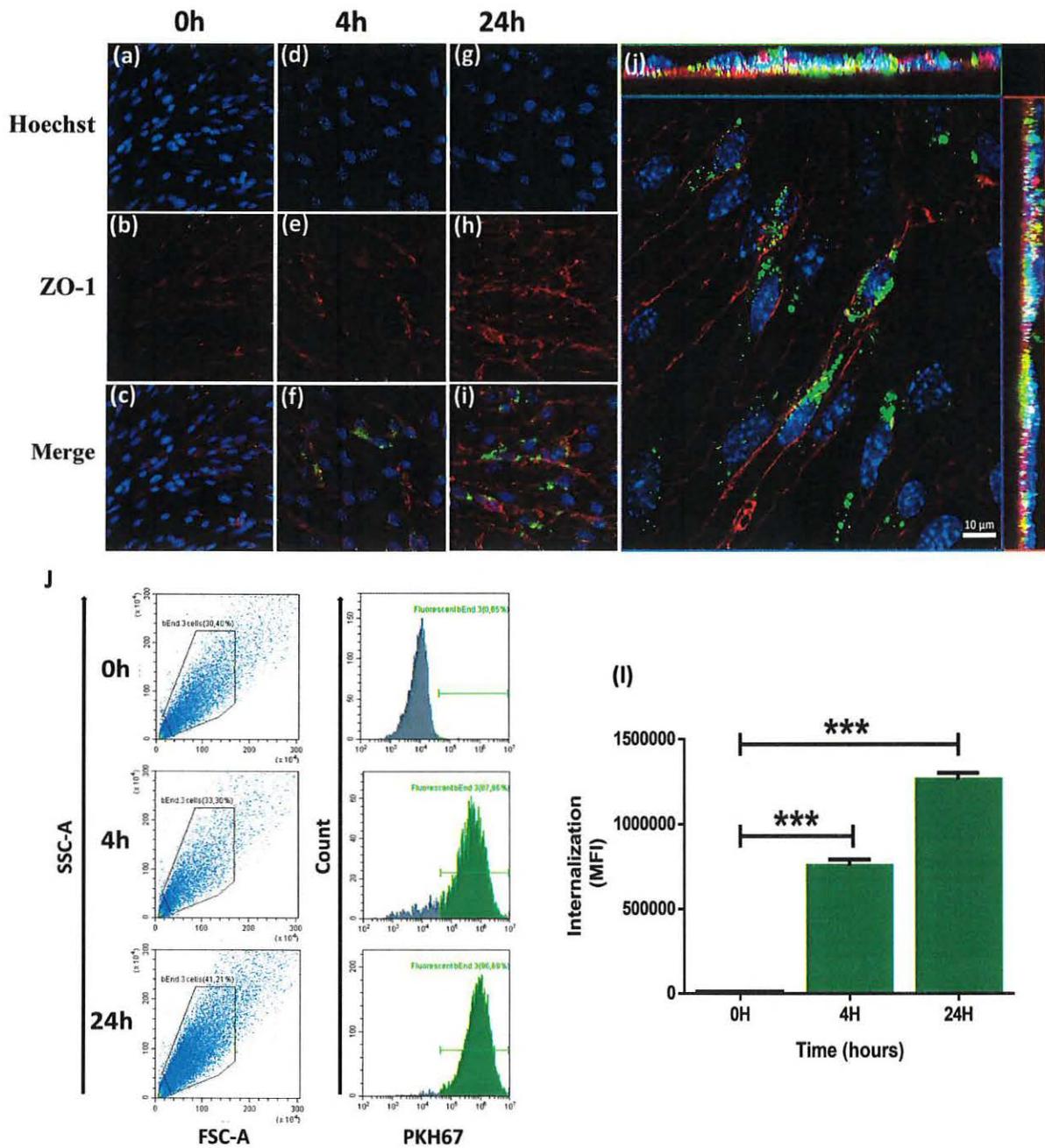


Fig. 4.4. EVs-PKH67 Internalization into mouse brain vascular endothelial cells (bEnd.3). (a-i) Confocal images of the uptake kinetic of PKH67 labelled-EVs after 0, 4 and 24 hours. (a, d and g) Cell nucleus labelled with Hoechst (blue). (b,e and h) ZO-1 antibody bound with Alexa Fluor 592 nm (red). (c,f and i) Merge pictures Images were acquired at 63X. (j) 3 dimensions of the confocal images of PKH67 labelled-EVs uptake after 24 hours. The scale bar is 10 μ m (k) Quantitative analysis of labelled EVs via Cytometry assay (l) Median fluorescence intensity (MFI) as a function of incubation time. * Significant difference $p < 0.05$ (GraphPad Prism 6).

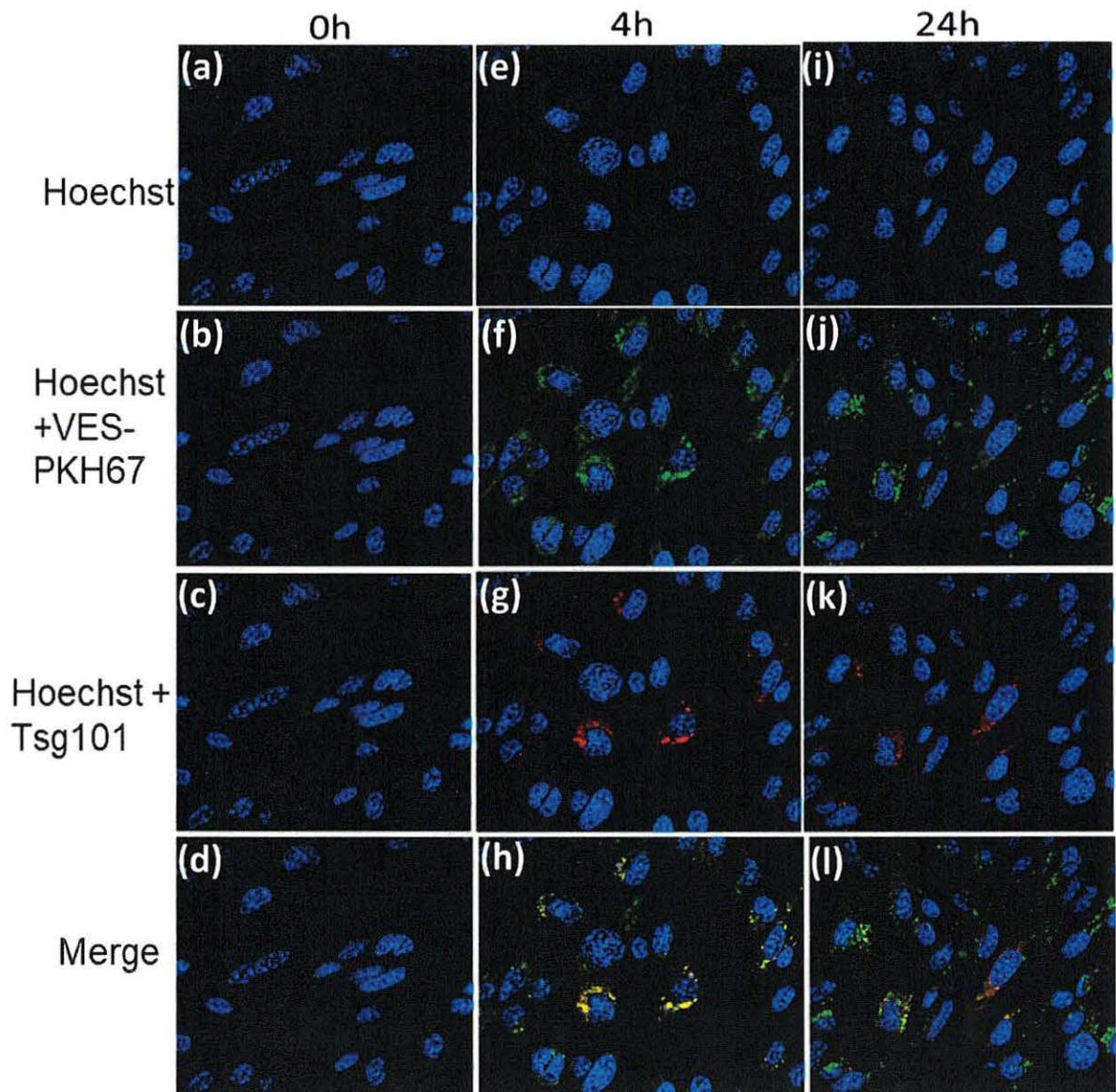


Fig. 4.5. Uptake of doubly labelled EVs in the bEnd.3 monolayer. Confocal images shown (a,b,c and d) cells incubated with labelled EVs at time zero. (e and i) The nuclei was stained with Hoechst (blue), (f and j) EVs were labelled with PKH67 (green), (g and k) then with TSG101 antibodies coupled to Alexa Fluor 592 nm (red). (h) and (l) showed the colocalization of the EVs marked with both PKH67 and TSG101 antibody (yellow). Images were acquired at 63X. The scale bar is 10 μ m.

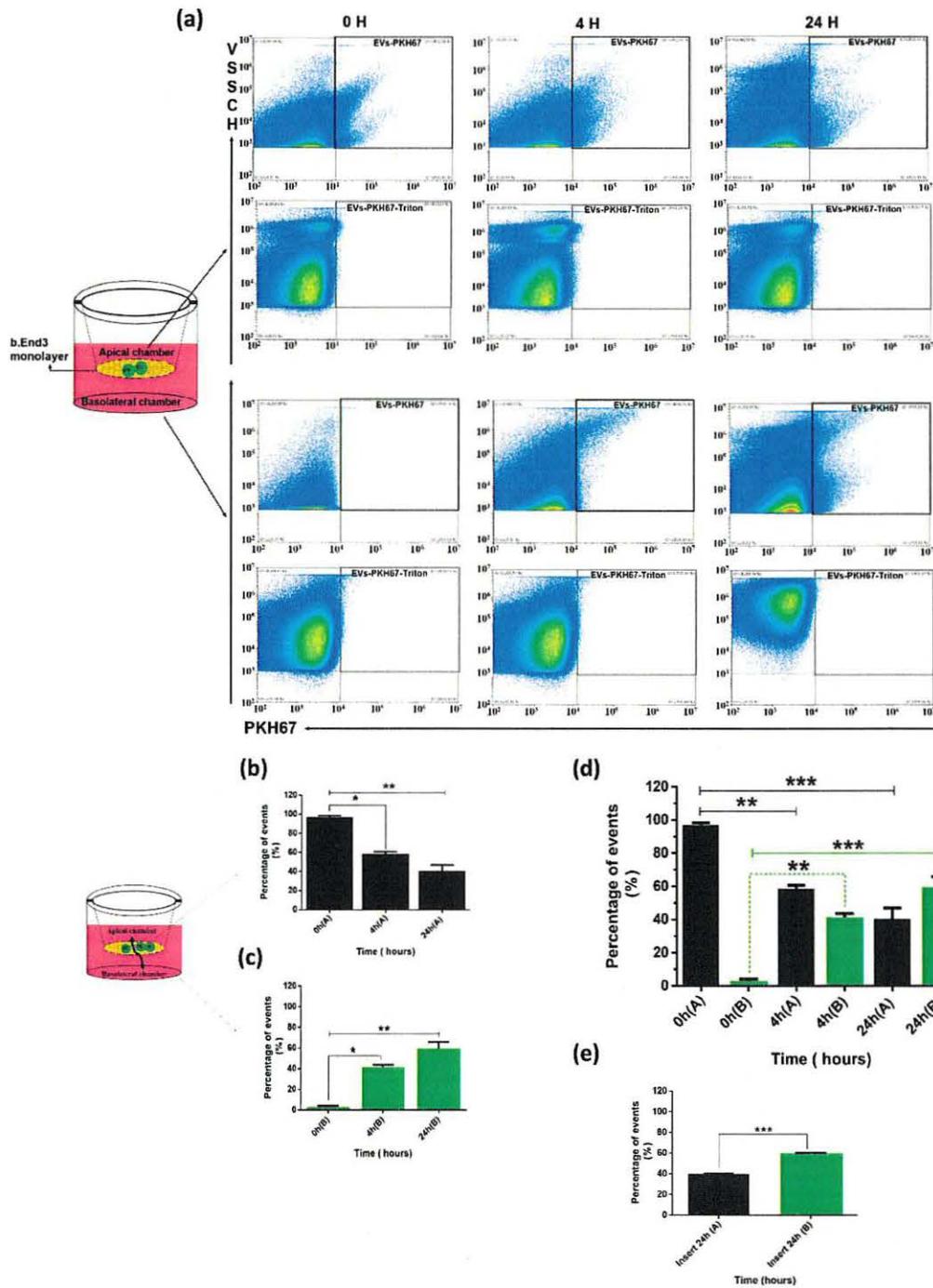


Fig. 4.6. EVs translocation across the bEnd.3 monolayer cells. (a) Illustration of bEnd.3 monolayer cells. Labelled EVs were added to the apical chamber of the Transwell and incubated with bEnd.3 cells. Both apical and basolateral chamber mediums were collected for CytoFlex analysis after different incubation times: 0, 4 and 24 h. (b) Quantitative analysis of the apical and (c) basolateral chamber medium. (d) Correlation between two chambers medium. Error bar in SEM and * $P < 0.05$. (e) Quantitative analysis of the apical and basolateral Transwell chambers.

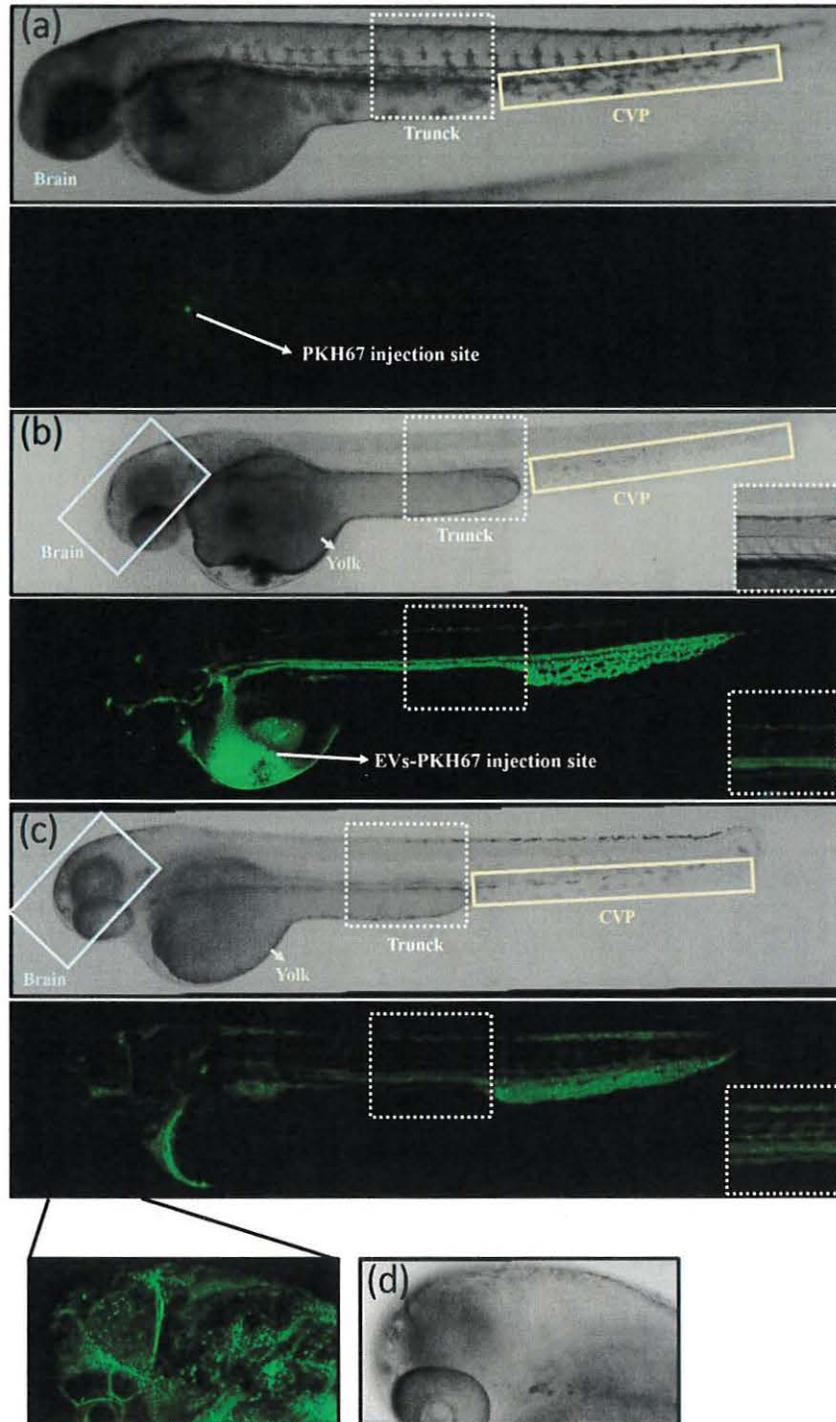


Fig. 4.7. Injection of the duct of Cuvier of PKH67-labelled plasma EVs. (a) Maximum intensity projection of confocal image of PKH67 alone post-injection (b) A confocal image at 4-hour post-injection (c) At 24-hour post-injections. (d) Bright field images of larvae head (right); corresponding images, 488 nm confocal fluorescent images of larvae head (left). The scale bar is 500 μm .

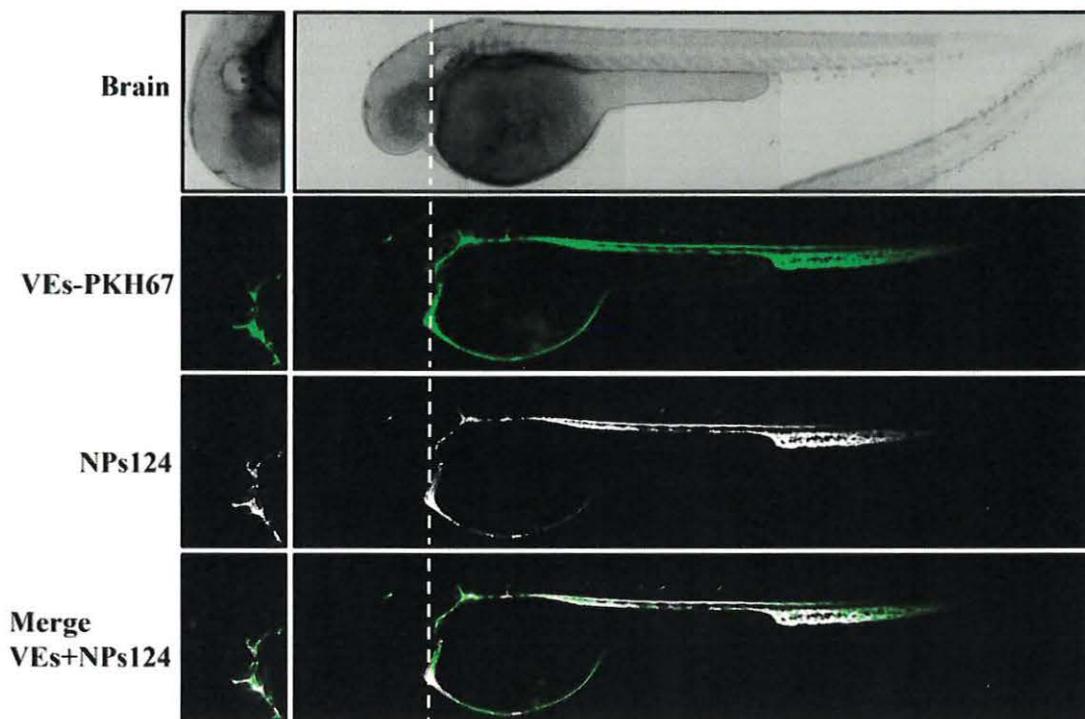


Fig. 4.8. Visualization of flu PEGylated NPs and EVs biodistribution in zebrafish larvae at 2 hours post injections. See text for details (X10). Insert: Brain imaging (X20).

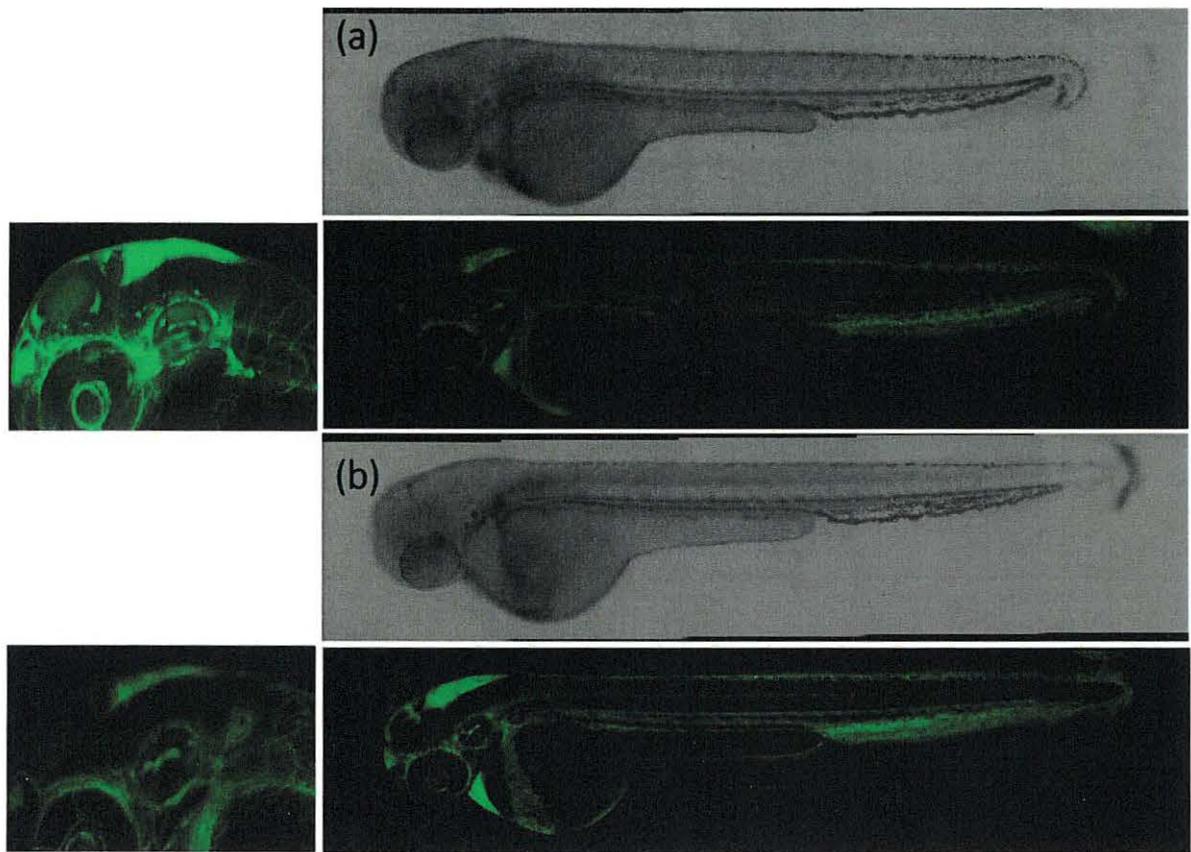


Fig. 4.9. Control experiments: injection of Dextran-FITC 10kDa. Maximum intensity projection confocal 10X stitched images of the same zebrafish larvae injected at 48 hpf with Dex-FITC **(a)** Biodistribution of fluorescence after 4 hours; **(b)** Biodistribution of fluorescence after 24 hours. Inserts: 20X confocal images of zebrafish larvae head.

5. DISCUSSION AND CONCLUSION (Article)

The communication between blood and brain is essential to transfer the nutrients from the blood stream to brain, and inversely, the waste materials from the brain to blood stream. Recently, EVs have been suggested to transfer their protein corona and other content between the blood and the brain in both directions (Agliardi *et al.*, 2019; Alvarez-Erviti *et al.*, 2011b; Kojima *et al.*, 2018b; Mustapic *et al.*, 2017). However, their translocation mechanism across endothelial cells representing the BBB remains unclear. Using isolated EVs labelled with the fluorescent dye PKH67, we have successfully demonstrated that the circulating EVs were taken up and released by bEnd.3 cells seeded on the Transwell model. The stability of the PKH67-EVs during the endocytosis and the transcytosis was demonstrated by the immunostaining of TSG101. The cerebral distribution of EVs following a peripheral injection remains a great challenge. We demonstrated that the injection of PKH67-labelled EVs into the vascular compartment of 48hpf zebrafish larvae leads to their cerebral distribution 24 hours after the injection.

Isolation and Characterization of Human Plasma EVs

Currently, there is no general agreement on an ideal method for isolating EVs. According to the International Extracellular Vesicles (ISEV) guidelines, the isolation of EVs is dependent on the application (Théry *et al.*, 2018). Here, we used a validated protocol as described previously by our laboratory (Haddad *et al.*, 2019a; Haddad *et al.*, 2019b). Once enriched, these EVs were characterized by TEM, NTA, nanoscale flow cytometry and by immunodetection of specific EVs markers.

An ideal technique for labelling EVs for imaging should implement the following criteria: a stable and sufficient signal intensity, high specificity and sensitivity without adverse influence on their biological functions. By NTA analysis, we found that the labelling with the lipophilic marker PKH67 did not affect the size of EVs and the PKH67-EVs were stable which was confirmed by the immunostaining of TSG101. Interestingly, we found that the human circulating EVs were internalized by the bEnd.3 endothelial cells and released without being degraded after 24 hours which were demonstrated by the double labelling PKH67 and TSG101.

In this study the particle size distribution of PKH67 labelled extracellular vesicles from human plasma was measured using two different techniques, NTA and nanoscale flow cytometry. NTA is the only technique that can measure individual nanoparticles (NPs) sizes and concentration simultaneously in solution, using laser light scattering. It enables to visualize the individual particles and track their Brownian motion. So the number based particle size distributions, based on individual particle measurement, is developed in a few minutes. In contrast to the flow cytometry, one of the limitations of the NTA assay was its inability to analyze labelled and unlabelled EVs simultaneously.

Characterization of an Endothelial Monolayer Model of BBB

There is a large number of *in vitro* BBB models. In this project, we choose the mouse brain endothelial cells (bEnd.3) to develop our tight monolayer model. The bEnd.3 cells are one of the best BBB models, which can express a lot of junction proteins compared to other cells (Watanabe *et al.*, 2013). In addition, they contain various transport systems mediated by carriers known to be expressed in BBB *in vivo* (Omidi *et al.*, 2003). In our cells monolayer, the barrier integrity was

demonstrated by the presence of essential tight junction proteins: claudin-5, occludin, ZO-1 and observation of targeted TEER values (Cancel *et al.*, 2018). Thus, in our conditions, bEnd.3 cells were a suitable and convenient model for evaluating BBB function, in particular the paracellular barrier (Watanabe *et al.*, 2013).

Study of internalization of labelled EVs and assessment of their passage efficiency

The uptake of different-sized and labelled EVs was investigated in a quantitative way using Confocal microscopy and flow cytometry, in an attempt to understand intracellular transport of labelled EVs within the BBB. Our quantitative flow cytometry analysis, showed that the internalization of labelled EVs increased with time. A recent study had shown that incubation of EVs at 37°C temperature for 24 hours could affect their membrane and facilitate their cellular uptake (Cheng *et al.*, 2019). Other parameters, including pH can affect the uptake of the EVs. A few years ago, a study showed that acidic pH could reduce exosome degradation (Ban *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017) while another study demonstrated that storage at pH 4 decreased the concentration of exosomes and increased their cellular uptake (Cheng *et al.*, 2019).

One of the limitations of our transcytosis assay is our result with the immunostaining of TSG101 supports the hypothesis that the released EVs maybe not come from newly formed EVs by bEnd.3 monolayers (Kurachi *et al.*, 2016).

Human plasma EVs biodistribution in zebrafish larvae blood circulation

The zebrafish model is a very accessible vertebrate model which allows for bridging the gap between cell assays and *in vivo* rodent models. The biodistribution of fluorescent-labelled EVs in zebrafish larvae could provide insights into distribution of plasmatic EVs in major organs. Indeed,

the zebrafish model recapitulates all the main organs of superior organisms with a high degree of gene conservation with humans. Moreover, it provides a convenient BBB models with a high optical transparency, enabling *in vivo* imaging with a very high spatio-temporal resolution (Kalueff *et al.*, 2014). Zebrafish conserves most of the BBB functions of mammalian (O'Brown *et al.*, 2018). The expression of tight junction proteins could be detected in larvae brain microvessels (Fleming *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2008a).

Our *in vivo* injection of EVs showed . The decrease of fluorescence at 24-hour post-injection which can be attributed to degradation and elimination of EVs and detachment of PKH67 (Cheng *et al.*, 2019). The relative fluorescent signal increases in extravascular regions, such as the caudal vein plexus (CVP) region or brain can be attributed to PKH67-EVs penetration in tissues at longer incubation time. Indeed, CVP displays tortuous vessels, slow blood flow, favouring EVs arrest and cell internalization (Ferreira, 2017; Sieber *et al.*, 2017; Verweij *et al.*, 2019).

The distribution of Dextran-FITC molecule is strikingly different from EVs or NPs distribution, showing a diffuse pattern of fluorescent across the larvae. This observation, supports the notion that fluorescence detected following EVs injection is actually associated with the EVs, at least in the few first hours following injection. The persistence of fluorescence in circulation supports the presence of intact EVs in circulation. This property could be advantageous for drug delivery application of EVs.

However, it is unclear at this time if diffusion of fluorescence in tissue is related only to intact EVs slowly translocating across blood barrier into tissues or if released PKH67 molecules (dye) are contributing to the observed signal. This point merits further investigations.

In order to fully the use of EVs as therapeutic nanocarriers, it is necessary to establish the intracellular pathways and the mechanisms by which their cargo is transported (Murphy *et al.*, 2019).

Currently, our knowledge is limited to produce a clear conclusion about the main route mechanism of the internalization and delivery of EVs in host cells. Some recent studies seem to agree on the endocytic pathway, due to the heterogeneity of the EVs in terms of size and origin, it is possible that they can interact differently with the receptor cells. These differences reflect the disagreement of studies on the type of main EVs endocytosis mechanisms, with clathrin-dependent, caveola-dependent, macropinocytosis, phagocytosis and uptake mediated by a lipid raft (Näslund *et al.*, 2014; Rana *et al.*, 2012).

Conclusions

Our results revealed that intact human plasma EVs are internalized by the bEnd.3 cells, they are able to cross the monolayer of endothelial cells *in vitro*. *In vivo* injection of EVs in zebrafish model demonstrated that peripheral circulating EVs could cross the BBB and biodistributed in the brain.

6. REFERENCES:

1. Maas, S.L.N., X.O. Breakefield, and A.M. Weaver, *Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles*. Trends in cell biology, 2017. **27**(3): p. 172-188.
2. Kowal, J., et al., *Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(8): p. E968-77.
3. Record, M., et al., *Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(1): p. 108-20.
4. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R.F. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. Journal of extracellular vesicles, 2014. **3**(1): p. 24641.
5. Jarmalaviciute, A. and A. Pivoriunas, *Exosomes as a potential novel therapeutic tools against neurodegenerative diseases*. Pharmacological Research, 2016. **113**: p. 816-822.
6. Cipolla, M., *Barriers of the CNS*. The Cerebral Circulation. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), 2009: p. 13-25.
7. Abbott, N.J., et al., *Structure and function of the blood-brain barrier*. Neurobiology of disease, 2010. **37**(1): p. 13-25.
8. Choi, Y.-K. and K.-W. Kim, *Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication*. BMB reports, 2008. **41**(5): p. 345-352.
9. Saraiva, C., et al., *Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases*. Journal of Controlled Release, 2016. **235**: p. 34-47.
10. Matsumoto, J., et al., *Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease?* Acta neuropathologica communications, 2017. **5**(1): p. 71.
11. Ridder, K., et al., *Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation*. PLoS biology, 2014. **12**(6).
12. Alvarez-Erviti, L., et al., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. Nature biotechnology, 2011. **29**(4): p. 341-345.
13. Cooper, J.M., et al., *Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice*. Movement Disorders, 2014. **29**(12): p. 1476-1485.
14. Kojima, R., et al., *Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 1-10.
15. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.

16. Alvarez-Erviti, L., et al., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. Nature Biotechnology, 2011. **29**(4): p. 341-345.
17. Mustapic, M., et al., *Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: A potential window into brain pathologic processes*. Frontiers in Neuroscience, 2017. **11**(MAY).
18. Kojima, R., et al., *Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment*. Nature Communications, 2018. **9**(1).
19. Agliardi, C., et al., *SNAP-25 in Serum Is Carried by Exosomes of Neuronal Origin and Is a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease*. Molecular Neurobiology, 2019. **56**(8): p. 5792-5798.
20. Théry, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. Journal of Extracellular Vesicles, 2018. **7**(1).
21. Haddad, M., et al., *Methylglyoxal and Glyoxal as Potential Peripheral Markers for MCI Diagnosis and Their Effects on the Expression of Neurotrophic, Inflammatory and Neurodegenerative Factors in Neurons and in Neuronal Derived-Extracellular Vesicles*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(19).
22. Haddad, M., et al., *Circulating and Extracellular Vesicles Levels of N-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine (CML) Differentiate Early to Moderate Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2019. **69**(3): p. 751-762.
23. Watanabe, T., et al., *Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bend.3, bend.5 and mouse brain endothelial cell 4*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2013. **36**(3): p. 492-495.
24. Omid, Y., et al., *Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies*. Brain Research, 2003. **990**(1-2): p. 95-112.
25. Cancel, L.M., et al., *Direct current stimulation of endothelial monolayers induces a transient and reversible increase in transport due to the electroosmotic effect*. Scientific Reports, 2018. **8**(1).
26. Cheng, Y., et al., *Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes*. Protein and Cell, 2019. **10**(4): p. 295-299.
27. Ban, J.J., et al., *Low pH increases the yield of exosome isolation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015. **461**(1): p. 76-79.
28. Zhao, Y., et al., *Effect of pH on the isolation of urinary exosome*. International Urology and Nephrology, 2017. **49**(1): p. 165-169.
29. Kurachi, M., M. Mikuni, and Y. Ishizaki, *Extracellular vesicles from vascular endothelial cells promote survival, proliferation and motility of oligodendrocyte precursor cells*. PLoS ONE, 2016. **11**(7).
30. Kalueff, A.V., A.M. Stewart, and R. Gerlai, *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders*. Trends in pharmacological sciences, 2014. **35**(2): p. 63-75.

31. O'Brown, N.M., S.J. Pfau, and C. Gu, *Bridging barriers: a comparative look at the blood–brain barrier across organisms*. *Genes & Development*, 2018. **32**(7-8): p. 466-478.
32. Jeong, J.-Y., et al., *Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish*. *Brain Research Bulletin*, 2008. **75**(5): p. 619-628.
33. Fleming, A., H. Diekmann, and P. Goldsmith, *Functional Characterisation of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish*. *Plos One*, 2013. **8**(10): p. 12.
34. Sieber, S., et al., *Zebrafish as an early stage screening tool to study the systemic circulation of nanoparticulate drug delivery systems in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 2017. **264**: p. 180-191.
35. Ferreira, M.A., *Functional characterization of tumour-derived exosomes in the zebrafish xenograft model*, in *Faculdade de Ciências*. 2017, Universidade de Lisboa, : Lisbon.
36. Verweij, F.J., et al., *Extracellular Vesicles: Catching the Light in Zebrafish*. *Trends in Cell Biology*, 2019. **29**(10): p. 770-776.
37. Murphy, D.E., et al., *Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking*. *Experimental and Molecular Medicine*, 2019. **51**(3).
38. Näslund, T.I., et al., *Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells*. *AIDS*, 2014. **28**(2): p. 171-180.
39. Rana, S., et al., *Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2012. **44**(9): p. 1574-1584.

SECTION 3 : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Discussion et propositions

Isoler et caractériser les VEs humaines

Le terme VE, inventé par la société internationale pour les vésicules extracellulaires (ISEV, <http://www.isev.org>), catégorise les vésicules en fonction de leur voie de biogenèse ou de libération (Ramirez *et al.*, 2018). En 2014, les membres du conseil d'administration de l'ISEV ont publié un éditorial de position détaillant leurs recommandations, sur la base de leur propre expertise établie, sur les "exigences expérimentales minimales pour la définition des VEs et leurs fonctions" (Théry *et al.*, 2018). Ces consignes servent à améliorer les résultats des VEs publiés.

Les VEs représentent une grande sous population vésiculaire, constituée principalement des microvésicules et des exosomes, qui portent souvent les caractéristiques des cellules qui les ont libérés (tableau 1-1). Elles contiennent des protéines, des lipides et du matériel génétique (figure 1-8). À l'heure actuelle, on constate un intérêt massif des études basées sur la littérature à propos de l'usage des VEs, plus particulièrement les exosomes, dans le cadre clinique pour les outils de diagnostics et thérapeutiques (Brenner *et al.*, 2019).

Une liste d'informations minimales pour les études des VEs (MISEV ou MISEV2014) a été fournie par l'ISEV, couvrant l'isolement, la caractérisation et les études fonctionnelles des VEs. Dans le but de sensibiliser les chercheurs, les rédacteurs en chef et les examinateurs de revues aux exigences expérimentales et de rapport spécifiques au domaine des VEs (Théry *et al.*, 2018).

Néanmoins, il n'y a aucun accord sur une méthode idéale pour isoler les VEs. Chaque méthode d'isolement et d'analyse (figure 2-1 et figure 2-2) a ses propres avantages et ses inconvénients.

Dans ce projet nous avons voulu mettre en avant l'efficacité de passage des VEs d'origine du plasma humain à travers la BHE *in vitro* et leurs distributions dans les larves du poisson-zèbre dans un second temps.

On a développé des méthodologies dans notre laboratoire pour suivre les VEs. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode d'analyse de suivi des nanoparticules (NTA NS300), qui permet de déterminer la concentration et le nombre des vésicules en solution (figure 1b). De plus, le NTA, il est capable de quantifier même les vésicules fluorescentes. Nous avons optimiser l'utilisation de

la Cytométrie en flux, plus particulièrement le CytoFlex pour détecté les VEs (figure 1c) , cette technique, permet l'analyse individuelle des nanoparticules vésiculaires et synthétiques dans un milieu biologique comme l'eau, PBS et le milieu de culture.

Ces méthodologies ouvrent des perspectives pour la suite des expériences *in vitro*. Dans notre démarche, il était important d'isoler et d'améliorer le protocole d'étiquetage des VEs, afin de visualiser leurs passages à travers la BHE. La méthode optimale utilisée dans ce projet a été déterminée dans notre laboratoire (Perrotte *et al.*, 2020). Tout comme d'autres études publiées en avant, nous avons réussi à isoler des VEs à partir du plasma humain (Perrotte *et al.*, 2020) (Fig. 3.4.1a).

Marquage et caractérisation des VEs humaines

Dans ce projet, j'ai réussi à marqué les VEs plasmatiques d'origine humaine, en utilisant le fluorophore PKH67 qui à une longueur d'onde d'émission de 490 nm et d'une excitation de lumière verte à 502 nm.

Le choix de la PKH67 s'est basé sur une profonde recherche bibliographique (tableau 2.1). Selon la Littérature, la PKH67 parmi les sondes les plus stables *in vitro* et *in vivo*. La PKH à un demi de vie *in vivo* entre 5 à 100 jours (Chuo *et al.*, 2018; Skardelly *et al.*, 2011). De plus, le signal de la PKH67 est stable et puissant pour l'imagerie. Cependant, nous avons réussi à marquer les VEs, comparés à l'instrument NTA, le cytoflex (Fig. 3.4.2b) a permis la détection de 44% de vésicules fluorescentes, alors que le NTA n'a pas pu détecter plus de 10% des VEs marquées (Fig. 3.4.2a). On pense que n'avons pas marquer toutes les vésicules, malgré qu'on a augmenté la concentration de la PKH67 à 16 μ M dans 100 μ g de VEs. Car, la PKH67 se fixe mieux sur les vésicules de taille entre 50 à 150 nm que les VEs inférieure à 50 nm à cause de leur petite bicouche lipidique. De plus, le NTA et CytoFlex ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter toutes les VEs fluorescences.

Les avantages de notre modèle de BHE *in vitro*

Après avoir isolé, caractérisé et marqué les VEs. Nous avons développé un modèle de BHE *in vitro* pour effectuer nos études de passage vésiculaires. Notre modèle utilise une lignée cellulaire disponible commercialement, les cellules endothéliales du cerveau murin bEnd.3, ce sont des cellules immortalisées qui représentent des caractéristiques de la BHE (Li *et al.*, 2010).

Par conséquent, notre modèle est plus accessible à d'autres équipes de recherche pour reproduire les résultats que nous avons obtenus. Cette lignée de cellules fournit une grande majorité de protéines de jonctions serrées (Watanabe *et al.*, 2013).

Notre modèle de monocouche bEnd.3 offre donc un éventail de possibilité pour étudier, la toxicité, le trafic et le mécanisme d'internalisation des VEs ou des NPs à travers la BHE. Avant d'utiliser le modèle BBB basé sur les cellules bEnd.3 pour l'étude de passage des VEs, le modèle a été optimisé et validé dans notre laboratoire avec une série d'expériences visant à atteindre une intégrité de barrière maximale pour la monocouche bEnd.3 (Fig. 3.4.3).

Les limites de notre modèle de monocouche endothéliale bEnd.3

Malgré que nous ayons indiqué qu'il est possible de créer une monocouche de cellules endothéliales *in vitro* à partir de la lignée cellulaire bEnd.3, notre modèle contient tout de même ses limites.

D'abord, les cellules bEnd.3 sont obtenues à partir des cultures cellulaires primaires immortalisées, pour établir une lignée cellulaire au potentiel de divisions illimitées, en échappant la sénescence cellulaire normale. De plus, les cellules bEnd.3 *in vitro* ne sont pas dans leur environnement normal et que par conséquent, leurs activités ne sont pas régulées par les autres cellules notamment les astrocytes, les neurones et les cellules microgliales comme dans le cas de la BHE *in vivo*.

Enfin, les cellules bEnd.3 expriment moins de protéines de jonctions serrées au moins dans la condition normale de cette étude par rapport aux cellules endothéliales primaires du cerveau murin (Yang *et al.*, 2017). Les cellules primaires mettent plus de temps à se développer que les autres lignées cellulaires et ont un potentiel de croissance limité même dans des conditions de croissance optimales et finissent par se sénescence et mourir. De plus, le coût de l'isolement et de la culture est souvent élevé. Ces cellules sont extrêmement sensibles nécessitant des nutriments supplémentaires non inclus dans les milieux classiques. Les cellules primaires sont initialement hétérogènes, elles représentent un mélange de types cellulaires présents dans le tissu et ne peuvent être maintenues *in vitro* que pendant une période de temps limitée (Yang *et al.*, 2017).

La biodistribution des VEs plasmatisques humaines dans la circulation sanguine des larves de poisson-zèbre

Ici, nous avons étudié la biodistribution des VEs dans un modèle de larves de poisson-zèbre. Ce modèle permet de combler l'écart entre les tests cellulaires et les modèles de rongeurs *in vivo*. En raison de sa taille, de sa facilité de maintien, de son développement rapide et de la nature hautement conservée de la génétique et de la biologie cellulaire avec les vertébrés supérieurs, le poisson-zèbre est un organisme approprié pour modéliser les maladies humaines (Kim et al., 2017; Umans & Taylor, 2012). En utilisant ce modèle, l'injection des VEs marquées à la PKH67 dans la circulation sanguine des larves pourrait fournir des informations sur le comportement et la distribution des VEs plasmatisques humaines dans les principaux organes de ces larves.

En effet, le modèle du poisson-zèbre récapitule tous les principaux organes d'organismes supérieurs avec un degré élevé de conservation des gènes chez l'homme. De plus, il fournit un modèle de BHE avec une transparence optique élevée et pratique permettant une imagerie *in vivo* avec une résolution spatio-temporelle très élevée (Kalueff et al., 2014). L'expression de protéines à jonction serrée a pu être détectée dans les microvaisseaux cérébraux des larves (Fleming et al., 2013; Jeong et al., 2008b).

Les preuves de distribution des VEs dans notre travail (Fig. 3.4.7) sont similaires à celles rapportées pour les liposomes injectés ou les VEs dérivées de tumeurs (Ferreira, 2017; Sieber et al., 2017). Dans l'ensemble, la quantité de vésicules fluorescentes utilisée dans cette expérience est 3000 fois moins, par rapport aux modèles murins (Lai et al., 2014).

Selon nos résultats, nous avons constaté une diminution de la fluorescence 24 heures après l'injection des VEs marquées à la PKH67 (Fig. 3.4.7). On pense que cela est dû soit à la dégradation des exosomes, soit au détachement de la PKH67.

Le signal fluorescent relatif augmente dans la région extravasculaire, comme la région du plexus veineux caudal (CVP) ou le cerveau (Fig. 3.4.7) peut être attribué la pénétration du colorant fluorophore dans les tissus à des temps d'incubation plus longs.

Il sera intéressant également de faire la même expérience de biodistribution des VEs dans les poissons-zèbre matures pour mieux comprendre l'interaction de ces VEs avec la biologie du poisson-zèbre. Il pourrait être une alternative intéressante aux modèles murins pour les études de passage des VEs vers le cerveau.

2. Conclusion et perspectives

En effet, le premier chapitre de cette mémoire décrit les évolutions et les challenges de la caractérisation des VEs et leurs comportements, en particulier leurs translocations *in vitro* dans les cellules endothéliales et leurs biodistributions *in vivo* dans les larves de poisson-zèbre.

En ce moment, divers outils de diagnostics basés sur les VEs sont en cours de développement (Beuzelin & Kaeffer, 2018; Chevillet *et al.*, 2014; He *et al.*, 2019). Nous ne savons toujours pas quels mécanismes sous-tendent la capacité des VEs à transférer des marchandises. Les recherches futures devraient être axées sur le développement des techniques permettant de mieux suivre la livraison des cargaisons des VEs afin de déterminer les voies impliquées dans ce processus.

Une attention particulière devrait être accordée à la séparation des sous-populations des VEs par chromatographie d'exclusion de taille (SEC), en tant que méthode efficace en une seule étape pour l'isolement des VEs (Böing *et al.*, 2014), impliquant la filtration d'une solution à travers une colonne de billes poreuses avec des rayons plus petits que les VEs d'intérêt. Au cours de ce processus, les fractions de solution seront élues par ordre décroissant de taille, et la fraction contenant des biomolécules avec la des VEs d'intérêt peut être isolée de manière sélective (Carnino *et al.*, 2019). Cela pourrait fournir un aperçu des composants des VEs qui sont importants dans la prestation fonctionnelle, réduire l'hétérogénéité de la population vésiculaire et dévoiler le mécanisme d'action de chaque sous-population vésiculaire.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus tout au long de ce projet concernant la partie de larve poisson-zèbre ouvrent la possibilité d'utiliser le modèle du poisson-zèbre mature pour étudier la biodistribution et le passage des VEs plasmatiques humaines vers le cerveau de manière plus rapide et efficace.

Surtout, si nous pouvons développer davantage le modèle pour étudier le mécanisme de passage des VEs, il peut représenter un modèle *in vivo* hautement informatif et applicable pour l'étude des VEs en milieu clinique. Un défi majeur entravant l'utilisation des VEs dans un contexte thérapeutique est la difficulté d'assurer la livraison à leurs sites d'action thérapeutique tout en évitant l'accumulation sur des sites hors cible. Une administration non spécifique diminue l'efficacité et peut induire des effets non spécifiques.

Liste des références

- Abbott NJ (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis* 36(3):437-449.
- Abbott NJ, Dolman DEM & Patabendige AK (2008) Assays to predict drug permeation across the blood-brain barrier, and distribution to brain. *Current Drug Metabolism* 9(9):901-910.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR & Begley DJ (2010a) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37(1):13-25.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR & Begley DJ (2010b) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37(1):13-25.
- Abbott NJ, Rönnbäck L & Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(1):41-53.
- Abrahamson EE & Ikonovic MD (2020) Brain injury-induced dysfunction of the blood brain barrier as a risk for dementia. *Experimental Neurology* 328.
- Agliardi C, Guerini FR, Zanzottera M, Bianchi A, Nemni R & Clerici M (2019) SNAP-25 in Serum Is Carried by Exosomes of Neuronal Origin and Is a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* 56(8):5792-5798.
- Aird WC (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* 100(2):174-190.
- Akdemir ES, Huang AY & Deneen B (2020) Astrocytogenesis: where, when, and how. *FI000Research* 9.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A & Rak J (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biol.* 10(5):619-624.
- Alenquer M & Amorim MJ (2015) Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection. *Viruses* 7(9):5066-5083.
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S & Wood MJ (2011a) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology* 29(4):341-345.
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S & Wood MJA (2011b) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29(4):341-345.
- Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, Griffin G, Guerin C, Ho JE, Shaw SY, Cohen KS, Vasan RS, Tedgui A, Boulanger CM & Wang TJ (2014) Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur. Heart J.* 35(42):2972-2979.
- Armulik A, Genové G & Betsholtz C (2011) Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell* 21(2):193-215.

- Asaba H, Hosoya KI, Takanaga H, Ohtsuki S, Tamura E, Takizawa T & Terasaki T (2000) Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J. Neurochem.* 75(5):1907-1916.
- Ban JJ, Lee M, Im W & Kim M (2015) Low pH increases the yield of exosome isolation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461(1):76-79.
- Barry OP, Praticò D, Savani RC & FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 102(1):136-144.
- Bauer H & Traweger A (2016) Tight junctions of the blood-brain barrier - A molecular gatekeeper. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 15(9):1016-1029.
- Bavisotto CC, Scalia F, Gammazza AM, Carlisi D, Bucchieri F, de Macario EC, Macario AJL, Cappello F & Campanella C (2019) Extracellular vesicle-mediated cell-cell communication in the nervous system: Focus on neurological diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2).
- Beard R, Gaboriau DCA, Gee AD & Tate EW (2019) Chemical biology tools for probing transcytosis at the blood-brain barrier. *Chem. Sci.* 10(46):10772-10778.
- Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R & Zlokovic BV (2010) Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype in the Adult Brain and during Brain Aging. *Neuron* 68(3):409-427.
- Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, Holtzman DM, Betsholtz C, Armulik A, Sallstrom J, Berk BC & Zlokovic BV (2012) Apolipoprotein e controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* 485(7399):512-516.
- Berndt P, Winkler L, Cording J, Breitzkreuz-Korff O, Rex A, Dithmer S, Rausch V, Blasig R, Richter M, Sporbert A, Wolburg H, Blasig IE & Haseloff RF (2019) Tight junction proteins at the blood-brain barrier: far more than claudin-5. *Cell. Mol. Life Sci.* 76(10):1987-2002.
- Betz AL, Firth JA & Goldstein GW (1980) Polarity of the blood-brain barrier: Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* 192(1):17-28.
- Betzer O, Perets N, Barnoy E, Offen D & Popovtzer R (2018) Labeling and tracking exosomes within the brain using gold nanoparticles. *Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications XV 2018*. Nicolau DV, Cartwright AN & Fixler D (Édit.) SPIE.
- Beuzelin D & Kaeffer B (2018) Exosomes and miRNA-loaded biomimetic nanovehicles, a focus on their potentials preventing type-2 diabetes linked to metabolic syndrome. *Frontiers in Immunology* 9(NOV).
- Blasig IE, Giese H, Schroeter ML, Sporbert A, Utepbergenov DI, Buchwalow IB, Neubert K, Schönfelder G, Freyer D, Schimke I, Siems WE, Paul M, Haseloff RF & Blasig R (2001) ·NO and oxyradical metabolism in new cell lines of rat brain capillary endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Microvasc. Res.* 62(2):114-127.
- Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A & Nieuwland R (2014) Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1).

- Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, Borisov A & Dore-Duffy P (2011) The CNS microvascular pericyte: Pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids and Barriers of the CNS* 8(1).
- Brenner AW, Su GH & Momen-Heravi F (2019) Isolation of extracellular vesicles for cancer diagnosis and functional studies. in *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), p 229-237.
- Brittain GCI, Chen YQ, Martinez E, Tang VA, Renner TM, Langlois MA & Gulnik S (2019) A Novel Semiconductor-Based Flow Cytometer with Enhanced Light-Scatter Sensitivity for the Analysis of Biological Nanoparticles. *Scientific Reports* 9(1).
- Busato A, Bonafede R, Bontempi P, Scambi I, Schiaffino L, Benati D, Malatesta M, Sbarbati A, Marzola P & Mariotti R (2016) Magnetic resonance imaging of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled exosomes from stem cells: A new method to obtain labeled exosomes. *Int. J. Nanomed.* 11:2481-2490.
- Campanella C, Pace A, Bavisotto CC, Marzullo P, Gammazza AM, Buscemi S & Piccionello AP (2018) Heat shock proteins in Alzheimer's disease: Role and targeting. *International Journal of Molecular Sciences* 19(9).
- Cancel LM, Arias K, Bikson M & Tarbell JM (2018) Direct current stimulation of endothelial monolayers induces a transient and reversible increase in transport due to the electroosmotic effect. *Scientific Reports* 8(1).
- Cao XY, Lu JM, Zhao ZQ, Li MC, Lu T, An XS & Xue LJ (2017) MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. *Neurosci. Lett.* 644:94-99.
- Carnino JM, Lee H & Jin Y (2019) Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respir. Res.* 20(1):240.
- Chen C, Zong S, Wang Z, Lu J, Zhu D, Zhang Y & Cui Y (2016) Imaging and Intracellular Tracking of Cancer-Derived Exosomes Using Single-Molecule Localization-Based Super-Resolution Microscope. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8(39):25825-25833.
- Chen YD, Fang YT, Cheng YL, Lin CF, Hsu LJ, Wang SY, Anderson R, Chang CP & Lin YS (2017) Exophagy of annexin A2 via RAB11, RAB8A and RAB27A in IFN- γ -stimulated lung epithelial cells. *Scientific Reports* 7(1).
- Cheng Y, Zeng Q, Han Q & Xia W (2019) Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein Cell* 10(4):295-299.
- Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogossova-Agadjanyan EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS & Tewari M (2014) Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111(41):14888-14893.
- Chiang CY & Chen C (2019) Toward characterizing extracellular vesicles at a single-particle level Tse-Hua Tan. *J. Biomed. Sci.* 26(1).
- Choi Y-K & Kim K-W (2008) Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB reports* 41(5):345-352.

- Chuo STY, Chien JCY & Lai CPK (2018) Imaging extracellular vesicles: Current and emerging methods. *J. Biomed. Sci.* 25(1).
- Cipolla M (2009) Barriers of the CNS. *The Cerebral Circulation. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA)* :13-25.
- Cocucci E, Racchetti G & Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology* 19(2):43-51.
- Colombo M, Raposo G & Théry C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology* 30:255-289.
- Coomer BL & Stewart PA (1985) Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc. Res.* 30(1):99-115.
- Cooper JM, Wiklander PO, Nordin JZ, Al-Shawi R, Wood MJ, Vithlani M, Schapira AH, Simons JP, El-Andaloussi S & Alvarez-Erviti L (2014) Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement Disorders* 29(12):1476-1485.
- Corso G, Heusermann W, Trojer D, Görgens A, Steib E, Voshol J, Graff A, Genoud C, Lee Y, Hean J, Nordin JZ, Wiklander OPB, El Andaloussi S & Meisner-Kober N (2019) Systematic characterization of extracellular vesicles sorting domains and quantification at the single molecule–single vesicle level by fluorescence correlation spectroscopy and single particle imaging. *Journal of Extracellular Vesicles* 8(1).
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA & Barres BA (2010) Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468(7323):562-566.
- Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR & McLean PJ (2012) Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol. Neurodegeneration* 7(1).
- Davidson SM, Takov K & Yellon DM (2017) Exosomes and Cardiovascular Protection. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 31(1):77-86.
- De Toro J, Herschlik L, Waldner C & Mongini C (2015) Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications. *Frontiers in Immunology* 6(MAY).
- Doyle LM & Wang MZ (2019) Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8(7).
- Duan P, Tan J, Miao Y & Zhang Q (2019) Potential role of exosomes in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of hypoxic diseases. *American Journal of Translational Research* 11(3):1184-1201.
- Durieu-Trautmann O, Foignat-Chaverot N, Perdomo J, Gounon P, Strosberg AD & Couraud PO (1991) Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium. *In Vitro Cell Dev Biol - Animal* 27(10):771-778.

- Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG & Vestweber D (2000) Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem* 275(36):27979-27988.
- El Ali A, Thériault P & Rivest S (2014) The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 15(4):6453-6474.
- El Andaloussi S, Lakhal S, Mäger I & Wood MJA (2013a) Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(3):391-397.
- El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO & Wood MJA (2013b) Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12(5):347-357.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35(4):495-516.
- Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L & Vekrellis K (2010) Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *Journal of Neuroscience* 30(20):6838-6851.
- Ferreira MA (2017) *Functional characterization of tumour-derived exosomes in the zebrafish xenograft model*. Master (Universidade de Lisboa, , Lisbon). <http://hdl.handle.net/10451/31510>
- Fitzner D, Schnaars M, Van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, Regen T, Hanisch UK & Simons M (2011) Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* 124(3):447-458.
- Fleming A, Diekmann H & Goldsmith P (2013) Functional Characterisation of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish. *Plos One* 8(10):12.
- Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen EL, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon HU, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q & Kroemer G (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 36(13):1811-1836.
- García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, Jastroch M, Johansson P, Ninkovic J, Yi CX, Le Thuc O, Szigeti-Buck K, Cai W, Meyer CW, Pfluger PT, Fernandez AM, Luquet S, Woods SC, Torres-Alemán I, Kahn CR, Götz M, Horvath TL & Tschöp MH (2016) Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166(4):867-880.
- Greenwood J, Pryce G, Devine L, Male DK, Dos Santos WLC, Calder VL & Adamson P (1996) SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. *Journal of Neuroimmunology* 71(1-2):51-63.

- Griffiths RE, Kupzig S, Cogan N, Mankelow TJ, Betin VMS, Trakarnsanga K, Massey EJ, Lane JD, Parsons SF & Anstee DJ (2012) Maturing reticulocytes internalize plasma membrane in glycophorin A-containing vesicles that fuse with autophagosomes before exocytosis. *Blood* 119(26):6296-6306.
- Gu X, Zhang J, Brann DW & Yu FSX (2003) Brain and retinal vascular endothelial cells with extended life span established by ectopic expression of telomerase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(7):3219-3225.
- Gupta A & Pulliam L (2014) Exosomes as mediators of neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* 11.
- Haddad M, Perrotte M, Khedher MRB, Demongin C, Lepage A, Fulop T & Ramassamy C (2019a) Methylglyoxal and Glyoxal as Potential Peripheral Markers for MCI Diagnosis and Their Effects on the Expression of Neurotrophic, Inflammatory and Neurodegenerative Factors in Neurons and in Neuronal Derived-Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 20(19).
- Haddad M, Perrotte M, Landri S, Lepage A, Fulop T & Ramassamy C (2019b) Circulating and Extracellular Vesicles Levels of N-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine (CML) Differentiate Early to Moderate Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 69(3):751-762.
- Harding C, Heuser J & Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology* 97(2):329-339.
- Hart MN, Van Dyk LF, Moore SA, Shasby MD & Cancilla PA (1987) Differential opening of the brain endothelial barrier following neutralization of the endothelial luminal anionic charge in vitro. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46(2):141-153.
- He C & Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. in *Annual Review of Genetics*, p 67-93.
- He D, Wang H, Ho SL, Chan HN, Hai L, He X, Wang K & Li HW (2019) Total internal reflection-based single-vesicle in situ quantitative and stoichiometric analysis of tumor-derived exosomal microRNAs for diagnosis and treatment monitoring. *Theranostics* 9(15):4494-4507.
- Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ & Sixma JJ (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood* 94(11):3791-3799.
- Hu L, Wickline SA & Hood JL (2015) Magnetic resonance imaging of melanoma exosomes in lymph nodes. *Magn. Reson. Med.* 74(1):266-271.
- Hwang DW, Choi H, Jang SC, Yoo MY, Park JY, Choi NE, Oh HJ, Ha S, Lee YS, Jeong JM, Gho YS & Lee DS (2015) Noninvasive imaging of radiolabeled exosome-mimetic nanovesicle using 99m Tc-HMPAO. *Scientific Reports* 5.
- Janzer RC & Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325(6101):253-257.
- Jarmalaviciute A & Pivoriunas A (2016) Exosomes as a potential novel therapeutic tools against neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* 113(Pt B):816-822.

- Jeong J-Y, Kwon H-B, Ahn J-C, Kang D, Kwon S-H, Park JA & Kim K-W (2008a) Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish. *Brain Res. Bull.* 75(5):619-628.
- Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH, Park JA & Kim KW (2008b) Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res. Bull.* 75(5):619-628.
- Jiang X, Zong S, Chen C, Zhang Y, Wang Z & Cui Y (2018) Gold-carbon dots for the intracellular imaging of cancer-derived exosomes. *Nanotechnology* 29(17).
- Johnstone RM (1992) The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem. Cell Biol.* 70(3-4):179-190.
- Johnstone RM (2005) Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol. Dis.* 34(3):214-219.
- Johnstone RM & Ahn J (1990) A common mechanism may be involved in the selective loss of plasma membrane functions during reticulocyte maturation. *BIOMED. BIOCHIM. ACTA* 49(2-3):S70-S75.
- Johnstone RM, Mathew A, Mason AB & Teng K (1991) Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: Evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *Journal of Cellular Physiology* 147(1):27-36.
- Kalueff AV, Stewart AM & Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 35(2):63-75.
- Kannan R, Chakrabarti R, Tang D, Kim KJ & Kaplowitz N (2000) GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: Evidence for luminal localization of Na⁺-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res.* 852(2):374-382.
- Kassis S, Lauter CJ, Stojanov M & Salem Jr N (1986) Exfoliation of the β -adrenergic receptor and the regulatory components of adenylate cyclase by cultured rat glioma C6 cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 886(3):474-482.
- Kido Y, Tamai I, Okamoto M, Suzuki F & Tsuji A (2000) Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier using in vitro cultured cells and in vivo BUI studies. *Pharmaceutical Research* 17(1):55-62.
- Kim YS, Ahn JS, Kim S, Kim HJ, Kim SH & Kang JS (2018) The potential theragnostic (diagnostic+therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 22(2):113-125.
- Kojima R, Bojar D, Rizzi G, Charpin-El Hamri G, El-Baba MD, Saxena P, Ausländer S, Tan KR & Fussenegger M (2018a) Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nature communications* 9(1):1-10.
- Kojima R, Bojar D, Rizzi G, Hamri GCE, El-Baba MD, Saxena P, Ausländer S, Tan KR & Fussenegger M (2018b) Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nat. Commun.* 9(1).

- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M & Thery C (2016a) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(8):E968-977.
- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M & Thery C (2016b) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113(8):E968-E977.
- Krämer-Albers EM & Frühbeis C (2013) Delivery on call: exosomes as “care packages” from glial cells for stressed neurons. *e-Neuroforum* 19(4).
- Kumar M & Nerurkar VR (2016) In vitro and in vivo Blood–Brain barrier models to study west Nile Virus Pathogenesis. in *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), p 103-113.
- Kurachi M, Mikuni M & Ishizaki Y (2016) Extracellular vesicles from vascular endothelial cells promote survival, proliferation and motility of oligodendrocyte precursor cells. *PLoS ONE* 11(7).
- Lai CP, Tannous BA & Breakefield XO (2014) Noninvasive in vivo monitoring of extracellular vesicles. in *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), p 249-258.
- Lakhter AJ & Sims EK (2015) Minireview: Emerging roles for extracellular vesicles in diabetes and related metabolic disorders. *Mol. Endocrinol.* 29(11):1535-1548.
- Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, Ruegg C & Le Pecq JB (2002) Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* 270(2):211-226.
- Le Lay S, Martinez MC & Andriantsitohaina R (2018) Extracellular vesicles as biomarkers and bioeffectors of metabolic syndrome. *Med. Sci.* 34(11):936-943.
- Lechardeur D & Scherman D (1995) Functional expression of the P-glycoprotein mdr in primary cultures of bovine cerebral capillary endothelial cells. *Cell Biol Toxicol* 11(5):283-293.
- Levy E (2017) Exosomes in the diseased brain: First insights from in vivo studies. *Frontiers in Neuroscience* 11(MAR).
- Levy SL, White JJ, Lackey EP, Schwartz L & Sillitoe RV (2017) WGA-alexa conjugates for axonal tracing. *Curr. Protoc. Neurosci.* 2017:1.28.21-21.28.24.
- Li G, Simon MJ, Cancel LM, Shi ZD, Ji X, Tarbell JM, Morrison Iii B & Fu BM (2010) Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: In vitro Blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Annals of biomedical engineering* 38(8):2499-2511.
- Li W, Zhang X, Wang J, Li M, Cao C, Tan J, Ma D & Gao Q (2017) TGFβ1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelialmesenchymal transition of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 8(56):96035-96047.
- Liu X & Fuentes EJ (2019) Emerging Themes in PDZ Domain Signaling: Structure, Function, and Inhibition. in *International Review of Cell and Molecular Biology*, Édité Galluzzi L (Elsevier Inc.), p 129-218.

- Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L & Fais S (2009) High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS ONE* 4(4).
- Maas SLN, Breakefield XO & Weaver AM (2017) Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol* 27(3):172-188.
- Majesky MW (2007) Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27(6):1248-1258.
- Matsumoto J, Stewart T, Sheng L, Li N, Bullock K, Song N, Shi M, Banks WA & Zhang J (2017a) Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta neuropathologica communications* 5(1):71.
- Matsumoto J, Stewart T, Sheng L, Li N, Bullock K, Song N, Shi M, Banks WA & Zhang J (2017b) Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta neuropathologica communications* 5(1):71.
- Mayor S & Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(8):603-612.
- McAndrews KM & Kalluri R (2019) Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Mol. Cancer* 18(1).
- Meng X, Pan J, Sun S & Gong Z (2018) Circulating exosomes and their cargos in blood as novel biomarkers for cancer. *Transl. Cancer Res.* 7:S226-S242.
- Meyers JR (2018) Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* 16(1).
- Mooradian DL & Diglio CA (1991) Production of a transforming growth factor-beta-like growth factor by RSV-transformed rat cerebral microvascular endothelial cells. *TUMOR BIOL.* 12(3):171-183.
- Morel L, Chiang MSR, Higashimori H, Shoneye T, Iyer LK, Yelick J, Tai A & Yang Y (2017) Molecular and functional properties of regional astrocytes in the adult brain. *Journal of Neuroscience* 37(36):8706-8717.
- Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, Valente N, Shreeniwas R, Sutton MA, Delcayre A, Hsu DH, Le Pecq JB & Lyerly HK (2005) A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* 3.
- Mulcahy LA, Pink RC & Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles* 3(1):24641.
- Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G & D'Souza-Schorey C (2009) ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Curr. Biol.* 19(22):1875-1885.

- Murphy DE, de Jong OG, Brouwer M, Wood MJ, Lavieu G, Schiffelers RM & Vader P (2019) Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Exp. Mol. Med.* 51(3).
- Muruganandam A, Herx LM, Monette R, Durkin JP & Stanimirovic DB (1997) Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB Journal* 11(13):1187-1197.
- Mustapic M, Eitan E, Werner JK, Jr., Berkowitz ST, Lazaropoulos MP, Tran J, Goetzl EJ & Kapogiannis D (2017) Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: A potential window into brain pathologic processes. *Frontiers in Neuroscience* 11(MAY).
- Näslund TI, Paquin-Proulx D, Paredes PT, Vallhov H, Sandberg JK & Gabrielsson S (2014) Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS* 28(2):171-180.
- Nath Neerukonda S, Egan NA, Patria J, Assakhi I, Tavlarides-Hontz P, Modla S, Munoz ER, Hudson MB & Parcells MS (2019) Comparison of exosomes purified via ultracentrifugation (UC) and Total Exosome Isolation (TEI) reagent from the serum of Marek's disease virus (MDV)-vaccinated and tumor-bearing chickens. *Journal of virological methods* 263:1-9.
- Nawaz M, Camussi G, Valadi H, Nazarenko I, Ekström K, Wang X, Principe S, Shah N, Ashraf NM, Fatima F, Neder L & Kislinger T (2014) The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat. Rev. Urol.* 11(12):688-701.
- O'Brown NM, Pfau SJ & Gu C (2018) Bridging barriers: a comparative look at the blood-brain barrier across organisms. *Genes & Development* 32(7-8):466-478.
- Oh HJ, Shin Y, Chung S, Hwang DW & Lee DS (2017) Convective exosome-tracing microfluidics for analysis of cell-non-autonomous neurogenesis. *Biomaterials* 112:82-94.
- Omidi Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S & Gumbleton M (2003) Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res.* 990(1-2):95-112.
- Ostermann G, Weber KSC, Zerneck A, Schröder A & Weber C (2002) JAM-I is a ligand of the $\beta 2$ integrin LFA-I involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* 3(2):151-158.
- Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J & Wong DT (2010) Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS ONE* 5(1).
- Pan BT & Johnstone RM (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* 33(3):967-978.
- Paolicelli RC, Bergamini G & Rajendran L (2019) Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience* 405:148-157.
- Perets N, Betzer O, Shapira R, Brenstein S, Angel A, Sadan T, Ashery U, Popovtzer R & Offen D (2019) Golden Exosomes Selectively Target Brain Pathologies in Neurodegenerative and Neurodevelopmental Disorders. *Nano Letters* 19(6):3422-3431.

- Pérez M, Avila J & Hernández F (2019) Propagation of tau via extracellular vesicles. *Frontiers in Neuroscience* 13(JUL).
- Perrotte M, Haddad M, Le Page A, Frost EH, Fulöp T & Ramassamy C (2020) Profile of pathogenic proteins in total circulating extracellular vesicles in mild cognitive impairment and during the progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 86:102-111.
- Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A & Antes TJ (2015) Integrated systems for exosome investigation. *Methods* 87:31-45.
- Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S & Czuczwar SJ (2018) Exosomes as possible spread factor and potential biomarkers in Alzheimer's disease: Current concepts. *Biomarkers Med.* 12(9):1025-1033.
- Prudhomme JG, Sherman IW, Land KM, Moses AV, Stenglein S & Nelson JA (1996) Studies of plasmodium falciparum cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cells. *International Journal for Parasitology* 26(6):647-655.
- Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, Lasič E, Zorec R, Plemenitaš A, Žagar E, Kreft M & Lenassi M (2018) PKH26 labelling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1860(6):1350-1361.
- Quek C & Hill AF (2017) The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483(4):1178-1186.
- Rajagopal N, Irudayanathan FJ & Nangia S (2019) Computational nanoscopy of tight junctions at the blood-brain barrier interface. *International Journal of Molecular Sciences* 20(22).
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P & Simons K (2006) Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(30):11172-11177.
- Ramirez MI, Amorim MG, Gadelha C, Milic I, Welsh JA, Freitas VM, Nawaz M, Akbar N, Couch Y, Makin L, Cooke F, Vettore AL, Batista PX, Freezor R, Pezuk JA, Rosa-Fernandes L, Carreira ACO, Devitt A, Jacobs L, Silva IT, Coakley G, Nunes DN, Carter D, Palmisano G & Dias-Neto E (2018) Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale* 10(3):881-906.
- Rana S, Yue S, Stadel D & Zöllner M (2012) Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44(9):1574-1584.
- Raposo G & Stahl PD (2019) Extracellular vesicles: a new communication paradigm? *Nature reviews. Molecular cell biology* 20(9):509-510.
- Rashed MH, Bayraktar E, Helal GK, Abd-Ellah MF, Amero P, Chavez-Reyes A & Rodriguez-Aguayo C (2017) Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences* 18(3).
- Record M, Carayon K, Poirot M & Silvente-Poirot S (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta* 1841(1):108-120.

- Régina A, Romero IA, Greenwood J, Adamson P, Bourre JM, Couraud PO & Roux F (1999) Dexamethasone regulation of P-glycoprotein activity in immortalized rat brain endothelial cell line, GPNT. *J. Neurochem.* 73(5):1954-1963.
- Rhea EM & Banks WA (2019) Role of the Blood-Brain Barrier in Central Nervous System Insulin Resistance. *Frontiers in Neuroscience* 13(JUN).
- Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp A-K, Schlaudraff J, Del Turco D, Starmann J, Macas J, Karpova D & Devraj K (2014a) Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS biology* 12(6).
- Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp AK, Schlaudraff J, Del Turco D, Starmann J, Macas J, Karpova D, Devraj K, Depboylu C, Landfried B, Arnold B, Plate KH, Höglinger G, Sülthmann H, Altevogt P & Momma S (2014b) Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation. *PLoS Biol.* 12(6).
- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD & Couraud PO (1994) Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 159(1):101-113.
- Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kajiwarra K, Fujii M, Suzuki M & Kanda T (2010) Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *Journal of Cellular Physiology* 225(2):519-528.
- Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L & Bernardino L (2016) Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release* 235:34-47.
- Schiera G, Di Liegro CM & Di Liegro I (2015) Extracellular Membrane Vesicles as Vehicles for Brain Cell-to-Cell Interactions in Physiological as well as Pathological Conditions. *BioMed Research International* 2015.
- Schorey JS, Cheng Y, Singh PP & Smith VL (2015) Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.* 16(1):24-43.
- Sharp CD, Jawahar A, Warren AC, Elrod JW, Nanda A, Alexander JS, Rutka JT, Khurana VG, Pollock BE, Piepmeier JM & Kondziolka D (2003) Gamma knife irradiation increases cerebral endothelial expression of intercellular adhesion molecule 1 and E-selectin. *Neurosurgery* 53(1):154-161.
- Shi S, Li T, Wen X, Wu SY, Xiong C, Zhao J, Lincha VR, Chow DS, Liu Y, Sood AK & Li C (2019) Copper-64 Labeled PEGylated Exosomes for In Vivo Positron Emission Tomography and Enhanced Tumor Retention. *Bioconjugate Chem.* 10.1021/acs.bioconjchem.9b00587.
- Sieber S, Grossen P, Detampel P, Siegfried S, Witzigmann D & Huwyler J (2017) Zebrafish as an early stage screening tool to study the systemic circulation of nanoparticulate drug delivery systems in vivo. *Journal of Controlled Release* 264:180-191.

- Skardelly M, Gaber K, Burdack S, Scheidt F, Hilbig H, Boltze J, Förschler A, Schwarz S, Schwarz J, Meixensberger J & Schuhmann MU (2011) Long-term benefit of human fetal neuronal progenitor cell transplantation in a clinically adapted model after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 28(3):401-414.
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM & Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biol.* 10(12):1470-1476.
- Smalley DM, Sheman NE, Nelson K & Theodorescu D (2008) Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *Journal of Proteome Research* 7(5):2088-2096.
- Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, Tsuruoka N, Tsuda T, Katsuya H, Miura Y, Asai K & Kato T (1999) Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 35(2):155-164.
- Staff PB (2018) Erratum: Correction: Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation (PLoS biology (2014) 12 6 (e1001874)). *PloS Biol.* 16(3):e1002623.
- Stins MF, Badger J & Sik Kim K (2001) Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb. Pathog.* 30(1):19-28.
- Stins MF, Prasadarao NV, Zhou J, Arditi M & Kim KS (1997) Bovine brain microvascular endothelial cells transfected with SV40-large T antigen: development of an immortalized cell line to study pathophysiology of CNS disease. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 33(4):243-247.
- Stolzing A & Grune T (2004) Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(6):743-745.
- Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H & Brech A (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 10(7):925-937.
- Takov K, Yellon DM & Davidson SM (2019) Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *J Extracell Vesicles* 8(1):1560809.
- Tang YT, Huang YY, Zheng L, Qin SH, Xu XP, An TX, Xu Y, Wu YS, Hu XM, Ping BH & Wang Q (2017) Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med* 40(3):834-844.
- Tatsuta T, Naito M, Oh-hara T, Sugawara I & Tsuruo T (1992) Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J Biol Chem* 267(28):20383-20391.
- Teifel M & Friedl P (1996) Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Experimental Cell Research* 228(1):50-57.
- Terasaki T & Hosoya KI (2001) Conditionally immortalized cell lines as a new in vitro model for the study of barrier functions. *Biol. Pharm. Bull.* 24(2):111-118.

- Théry C, Amigorena S, Raposo G & Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3.
- Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J & Amigorena S (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* 166(12):7309-7318.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman MLD, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DRF, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chaudhuri AD, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FAW, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, de Candia P, De Santana EF, Jr., De Wever O, del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TAP, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabriellsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DCI, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszi RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AGE, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ, II, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li ITS, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lőrincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SLN, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Jr., Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-t Hoen ENM, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loughlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Ostegaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BCH, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IKH, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD,

- Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KMA, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PRM, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, II, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BWM, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJC, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Jr., Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MHM, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D & Zuba-Surma EK (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles* 7(1).
- Tkach M & Théry C (2016) Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164(6):1226-1232.
- Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem, Jr. & Heine U (1981) Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 645(1):63-70.
- Ueno M, Nakagawa T, Wu B, Onodera M, Huang CL, Kusaka T, Araki N & Sakamoto H (2010) Transporters in the brain endothelial barrier. *Current Medicinal Chemistry* 17(12):1125-1138.
- Van Der Vos KE, Abels ER, Zhang X, Lai C, Carrizosa E, Oakley D, Prabhakar S, Mardini O, Crommentuijn MHW, Skog J, Krichevsky AM, Stemmer-Rachamimov A, Mempel TR, El Khoury J, Hickman SE & Breakefield XO (2016) Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro-Oncology* 18(1):58-69.
- Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J & Anderson JM (2010) Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J. Cell Sci.* 123(16):2844-2852.
- Verweij FJ, Hyenne V, Van Niel G & Goetz JG (2019) Extracellular Vesicles: Catching the Light in Zebrafish. *Trends in Cell Biology* 29(10):770-776.
- Vietri M, Radulovic M & Stenmark H (2020) The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21(1):25-42.
- Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A & Kataoka Y (2013) Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bend.3, bend.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol. Pharm. Bull.* 36(3):492-495.
- Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA & Couraud PO (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB Journal* 19(13):1872-1874.

- Wen CJ, Zhang LW, Al-Suwayeh SA, Yen TC & Fang JY (2012) Theranostic liposomes loaded with quantum dots and apomorphine for brain targeting and bioimaging. *Int. J. Nanomed.* 7:1599-1611.
- Wijisman JA & Shivers RR (1998) Immortalized mouse brain endothelial cells are ultrastructurally similar to endothelial cells and respond to astrocyte-conditioned medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 34(10):777-784.
- Winston CN, Goetzl EJ, Baker LD, Vitiello MV & Rissman RA (2018) Growth Hormone-Releasing Hormone Modulation of Neuronal Exosome Biomarkers in Mild Cognitive Impairment. *J. Alzheimer's Dis.* 66(3):971-981.
- Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13(3):269-288.
- Wollert T & Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464(7290):864-869.
- Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PTM, Schwarzmann G, Möbius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ & Stoorvogel W (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278(13):10963-10972.
- Xiao L, Yang C, Dorovini-Zis K, Tandon NN, Ades EW, Lal AA & Udhayakumar V (1996) Plasmodium falciparum: Involvement of additional receptors in the cytoadherence of infected erythrocytes to microvascular endothelial cells. *EXP. PARASITOL.* 84(1):42-55.
- Xu J, Camfield R & Gorski SM (2018) The interplay between exosomes and autophagy - partners in crime. *J. Cell Sci.* 131(15).
- Xu J, Qu ZX, Moore SA, Hsu CY & Hogan EL (1992) Receptor-Linked Hydrolysis of Phosphoinositides and Production of Prostacyclin in Cerebral Endothelial Cells. *J. Neurochem.* 58(5):1930-1935.
- Xu W, Zeng S, Li M, Fan Z & Zhou B (2017) Aggf1 attenuates hepatic inflammation and activation of hepatic stellate cells by repressing Ccl2 transcription. *J. Biomed. Res.* 31(5):428-436.
- Yang C & Robbins PD (2011) The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin. Dev. Immunol.* 2011.
- Yang S, Mei S, Jin H, Zhu B, Tian Y, Huo J, Cui X, Guo A & Zhao Z (2017) Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier. *PLoS ONE* 12(10).
- Zhang Y, Hao Z, Wang P, Xia Y, Wu J, Xia D, Fang S & Xu S (2019) Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. *Cell Prolif.* 52(2).
- Zhao Y, Chen K, Li H & Wu H (2017) Effect of pH on the isolation of urinary exosome. *Int. Urol. Nephrol.* 49(1):165-169.
- Zong S, Zong J, Chen C, Jiang X, Zhang Y, Wang Z & Cui Y (2018) Single molecule localization imaging of exosomes using blinking silicon quantum dots. *Nanotechnology* 29(6).

