Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Charlotte JAVALET

Thèse dirigée par **Rémy SADOUL**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Rôle des exosomes comme nouvelle voie de communication entre les neurones

Thèse soutenue publiquement le **30 septembre 2016**,
devant le jury composé de :

Monsieur Stefan NONCHEV
Professeur, Université Grenoble Alpes (Président)
Madame Sophie ROME
Directrice de Recherche, Laboratoire CarMen, Lyon (Rapporteur)
Monsieur Alexandre FAVEREAUX
Maître de Conférences, Université Bordeaux 2 (Rapporteur)
Madame Clotilde THERY
Directrice de Recherche, Institut Curie, Paris (Examinateur)
Monsieur Jérôme GARIN
Directeur de Recherche, CEA, Grenoble (Examinateur)
Monsieur Rémy SADOUL
Professeur, Université Grenoble Alpes (Examinateur)

Remerciements

Alors voilà, nous y sommes, l'heure d'écrire les remerciements a sonné et signe la fin d'une grande aventure : la thèse ! Comme toute aventure, la destination et le chemin sont importants mais ce que nous retenons surtout ce sont les rencontres que l'on y fait.

Avant tout, je souhaiterais remercier mon jury de thèse. Stefan Nonchev, Clotilde Théry et Jérome Garin, merci pour votre présence et pour le temps que vous m'avez consacré. Un grand merci à Sophie Rome et Alexandre Favereaux pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit et à l'évaluation de mon travail de thèse ainsi que pour leur expertise dont ils m'ont fait part.

Je souhaiterais maintenant remercier Rémy Sadoul sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. Rémy, un grand merci pour ta confiance et pour m'avoir confié ce magnifique projet. Merci pour l'éducation scientifique que tu m'as donnée ainsi que pour ta convivialité, ta générosité, ton écoute et ton féminisme !

Cette thèse n'aurait pas été la même sans l'environnement chaleureux de l'équipe 2. Bien plus qu'une équipe, je crois que tous les petits Sadouliens s'accorderaient à dire que cette équipe c'est comme une deuxième famille dans laquelle les étudiants sont chouchoutés !

Tout d'abord, un grand merci à Christine, un doux mélange de gentillesse et de rigueur, qui m'a énormément appris mais aussi transmis beaucoup de bonnes habitudes. Merci d'avoir pris soin de moi depuis mes premiers pas dans l'équipe en L3, il y a 6 ans maintenant... Merci sincèrement pour ton écoute, tes conseils, ta bienveillance et ce même lorsqu'il fallait me mettre dehors !

Je voudrais aussi remercier Béa, quelle fraicheur de t'avoir auprès de nous dans le labo. Quand je parle de fraicheur, je ne fais en rien référence à l'aération au dessus de ta paillasse qui est responsable de ton look hivernal en plein été… mais bien à ta joie de vivre communicative ! Merci pour ta bonne humeur et pour ton rire inoubliable ! Merci pour ta philosophie de vie, ta disponibilité, ton écoute et pour tout ce que tu m'as appris.

Merci aussi à Sandrine avec qui j'ai partagé l'aventure des exosomes ko Alix. Sandrine, merci pour ta gentillesse, pour ta disponibilité et ta patience. Un grand merci à Fiona pour les expériences de ME et pour m'avoir confié les rênes du microscope pour trouver une aiguille dans une botte de foin… mais surtout merci pour ta grande gentillesse et ta patience qui m'ont permis (j'espère) de progresser en anglais.

Merci chaleureusement à Anne. Merci pour ta bonne humeur, nos discussions « Girly » autour d'un cappuccino, ton esprit de contradiction, mais surtout pour ton réconfort (± calorique) et ton écoute. Je remercie également Yves pour m'avoir transmis quelques unes de ses grandes connaissances. Merci pour ton aide et tes conseils sur les neurones et la microscopie. Je remercie aussi José, le post-doc du 2ème étage, pour sa gentillesse et pour nos discussions pendant les dissections. Merci également à Fred pour son travail.

Je voudrais maintenant remercier une autre post-doc : Karine. Ton arrivée au labo a coïncidé avec mon M2 et donc mes débuts sur les exosomes. Au fil des dissections, nous avons appris à bien nous connaître et je crois maintenant que je ne peux plus rien te cacher. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris sur les

exosomes. Tu as été une alliée au cours de cette thèse avec qui j'ai partagé un quotidien neuronal parfois difficile. Merci pour tous tes conseils et pour m'avoir écouté un bon nombre de fois dans le confessionnal de la culture de neurone.

Mes remerciements s'adressent maintenant aux autres petits Sadouliens, passés et présents. Merci à Gaëlle, Gilles et Agnès pour les soirées passées ensemble, preuve que l'on ne quitte jamais vraiment l'équipe 2.

Un grand merci à Mathilde pour m'avoir passé le flambeau des exosomes neuronaux. Merci d'avoir pris soin de moi pendant mon stage de M2. Merci pour ton accueil, ta gentillesse et pour m'avoir transmis tes connaissances. Merci aussi à l'ESCRT-boy émigré aux Etats-Unis, Romain, pour tous ses conseils et sa gentillesse.

Merci aussi à Vincent pour tous les bons moments passés ensemble et pour nos discussions. Merci surtout…pour m'avoir rendu un peu moins naïve ! 1 chance sur 160 000 et tu y as cru, belle victoire ! Mais le maître est trop puissant, la preuve en est : tu nous as (encore) tous bien eus…Margaux n'est pas un prénom de garçon. Quoiqu'il en soit, félicitations et je vous souhaite beaucoup de bonheur.

Je voudrais remercier chaleureusement Marine, qui je crois, on peut le dire est bien plus bavarde que moi ! Merci de m'avoir mis le pied à l'étrier pour les NeuroDoc. Merci pour l'élan que tu nous as donné dans tous nos projets/délires post-thèse, congrès etc. Merci aussi pour tous tes bons conseils et ce depuis mon M1 jusqu'au jour J. Merci pour ta bonne humeur, nos grandes discussions et nos fous rires ! Merci pour ta générosité et pour toutes les petites attentions que tu as eues envers moi.

Enfin, je remercie et j'encourage le nouveau poulain de l'écurie. Joseph, thank you so much for your kindness and for your patience in particular with my English. I wish you a very nice PhD with Alix in Spineland !

Je remercie aussi les autres étudiants du GIN, passés ou présents dont Anouk, Marie-Lise, Alexis, Muriel, Marc, Chrystelle, Maxime, Julie, Rébecca, Marta et Eléa (dont le rire et la bonne humeur sont inoubliables). Bonne continuation à ceux qui ont déjà franchi l'obstacle et bon courage à ceux qui l'abordent.

Merci également à Hélène pour nos journées de manip en binôme mais surtout pour les bons moments passés ensemble autour d'un Mojito ou d'un Western blot. Te voici justement au pays du Western galopant vers de nouvelles aventures. Merci pour ta bonne humeur et tes petites attentions, particulièrement pour la mini-robe de cheerleader de l'Université du Texas : Yihaaa et vive le rôse ! Merci également à Audrey Guttin et Jean-Paul Issartel pour votre disponibilité et vos conseils.

Je voudrais aussi remercier Amélie, Véronique, Margaret, Nicolas et Nathalie S de l'équipe administrative du GIN pour leur travail et leur gentillesse. Merci également à Karine M pour sa bonne humeur et la générosité qu'elle a eue envers nous ainsi que pour son aide précieuse dans l'organisation du congrès. Merci aussi à Georges et Annie pour leur accueil, leur disponibilité et leur gentillesse. Je remercie également les animaliers du GIN pour leur aide précieuse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Julien Fauré et Laurence Aubry, pour le temps qu'ils m'ont consacré. Merci pour votre écoute et vos conseils sur l'avancée de ma thèse.

Je voudrais aussi remercier nos collaborateurs et leur équipe : Amy Buck et Al Ivens de l'Université d'Edinbourgh pour le séquençage, Gilber Di Paolo de l'Université Columbia pour la lipidomique, Guy Schoehn de l'IBS pour la cryo-ME et Yoan Couté du CEA de Grenoble pour la protéomique.

Je souhaiterais remercier les autres membres du GIN pour leur convivialité et les bons moments passés ensemble, je pense particulièrement aux membres des équipes 1, 12 et 13 ainsi qu'à Yasmina. Merci aussi à Julie Brocard pour m'avoir fait passer la (enfin LES) portes du P2+ ! Un grand merci pour tout ce que tu m'as appris sur la production de lentivirus ! Ca a changé ma vie !

Je tiens également à remercier deux personnes avec qui je n'ai pas travaillé en thèse mais qui m'ont fait partager leur passion de la Recherche et qui m'ont énormément appris.

Je pense en premier lieu à Violetta Zujovic. Merci Violetta pour tout ce que tu m'as appris, de l'utilisation d'une pipette, à la culture cellulaire, en passant par la chirurgie et la perfusion ! Waouh quelle première expérience dans le monde de la Recherche ! Merci beaucoup pour la confiance que tu m'as accordée alors que je n'étais qu'une petite L1. Je ne l'oublierai jamais. Хвала.

Je voudrais aussi remercier Céline Nicolas. Céline, merci mille fois pour cette expérience incroyable dans le monde de la plasticité synaptique ! Merci pour ta grande confiance et ton accueil au labo mais aussi en dehors. Tu as été d'une grande générosité avec moi et je ne l'oublierai jamais. Merci pour nos discussions et pour tout ce que tu m'as enseigné. Je sais que j'ai eu beaucoup de chance de travailler avec toi dans le labo de Graham et je sais aussi que cette chance je te la dois. Très sincèrement : merci. Par la même occasion, je souhaite remercier Graham Collingridge pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Il est temps de remercier les coupains, que j'ai un peu délaissés ces derniers-temps. Merci à Célia, Mathieu, Petit-Flo et Grand-Flo pour votre écoute, votre bonne humeur et votre humour ! Merci aussi à mes deux grandes amies, Flora et Sarah ! Les filles, bon courage pour la fin de vos thèses et tous mes vœux de bonheur pour vos petits bouts présents ou sur le point d'arriver. Flora, merci pour tous les bons moments passés ensemble et pour nos nuits blanches de travail ! Merci pour ton écoute et ta gentillesse. Sarah, merci pour nos longues marches et déjeuners à refaire le monde ! Merci aussi pour ton écoute et pour tous tes précieux conseils.

Un grand merci à ma famille et particulièrement à mes parent pour leur confiance et leur soutient. Merci à vous de m'avoir permis de faire ce que j'aimais. Je remercie tendrement ma sœur Natacha pour son soutien et sa gentillesse. Nat, rassure-toi, Chacha-Service devrait reprendre ses fonctions très prochainement !

Je remercie aussi mon petit trésor qui depuis un an et demi maintenant fait le chemin de la vie avec nous. Merci pour tout l'amour et le bonheur que tu nous apportes.

J'adresse mes derniers remerciements à la personne sans qui je ne serais pas qui je suis : Jérémy. Merci pour : … tout ! Merci d'être toi, d'être là et pour ce que nous construisons ensemble.

(Et bien sûr : merci à Nup-Nup pour sa grande disponibilité et ses gros câlins !)

Abréviations

Alix : Alg2 (Apoptosis Link Gene 2) Interacting Protein X

AMPA : α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid

ARNm : ARN messager

Cer : Céramide

CHMP : Charged Multivesicular Body Protein

Chol : Cholestérol

DG : Diacylglycérol

ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

GFP : Green Fluorescent Protein

ILV : IntraLuminal Vesicles

LimK1 : Lim Kinase 1

LBPA : Lyso-bis-phosphatidic acid

LTP : Potentialisation à Long Terme

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast

MVE : MultiVesicular Endosome

miR : microARN

NMDA : N-Methyl-D-Aspartic acid

PA : Acide Phosphatidique

PC : PhosphatidylCholine

PE : Phosphatidyl-Ethanolamine

PI : PhosphatidylInositol

PLP : Proteolipidic Protein

PS : PhosphatidylSérine

RISC : RNA-induced silencing complex

SM : Sphingomyéline

SNARE : SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor

TeNT : Tetanus NeuToxine, toxine du tétanos

TTC : Fragment C-terminal de la chaîne lourde de la toxine du tétanos

VAMP2 : Vesicular Associated Membrane Protein

UTR : UnTranslated Region

Sommaire

Avant propos **5**

Introduction **7**

1. Les exosomes : nanovésicules d'origine endosomale **9**

1.1. Biogenèse des exosomes 11

1.1.1. La machinerie ESCRT 13

1.1.2. Autres acteurs de la formation des MVE 17

1.1.3. Alix au pays des endosomes multivésiculés 18

1.1.4. Autres fonctions d'Alix 21

1.2. Sécrétion des exosomes 23

1.3. Composition biochimique des exosomes 25

1.3.1. Lipides 25

1.3.2. Protéines 28

1.3.3. Acides nucléiques 29

1.4. Fixation des exosomes sur une cellule cible 33

1.4.1. Interaction ligand-récepteur 33

1.4.2. Fusion 33

1.4.3. Endocytose 34

2. Communication exosomale dans le système nerveux central **36**

2.1. La transmission synaptique 36

2.2. Les exosomes neuronaux 38

2.3. Effet des exosomes neuronaux 39

2.4. Effet des exosomes de neuroblastomes 39

2.5. Effet des exosomes de cellule gliales sur les neurones 40

2.6. Les exosomes comme nouvelle voie de communication entre les neurones (Annexe 1) 42

3. Les microARN et les neurones **43**

3.1. Biogenèse et effet des microARN 43

3.2. Nomenclature 45

3.3. Régulation des microARN par l'activité neuronale 47

3.4. Rôles des microARN dans la plasticité synaptique 48

3.5. Exemple du miR-134 50

4. Objectifs de la thèse **52**

Matériel et Méthodes **53**
1. Culture primaire de neurones corticaux et purification des exosomes **54**
2. Culture primaire de neurones d'hippocampe **67**
3. Séquençage microARN **67**
4. Incubation des exosomes neuronaux **68**
5. Clonages **68**
6. Production des lentivirus **69**
7. Test luciférase **69**
8. Transfection des neurones **70**
9. Analyse du volume de l'épine dendritique **70**
10. Fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) **71**
11. Purification des exosomes de MEF et iMEF **71**
12. Cryo-microscopie électronique **72**
13. Nanosight **72**
14. Anticorps **73**
15. Western blot **74**
16. Analyse lipidomique **75**
Résultats **76**
1. Les exosomes neuronaux se fixent spécifiquement aux neurones **77**
1.1. Contexte de l'étude 77
1.2. Neuronal exosomes binding specificities 79
2. Le miRNome des neurones et de leurs exosomes **92**
2.1. Les exosomes neuronaux ne contiennent que des ARN courts 92
2.2. La stimulation synaptique ne modifie pas l'expression des microARN 94
2.3. Composition en microARN des exosomes 96
2.4. hnRNPA2B1 ne régule pas l'export des microARN dans les exosomes neuronaux 97
3. Effet biologique des exosomes neuronaux **99**
3.1. Régulation du volume de l'épine par les exosomes neuronaux 99
3.2. Passage du miR-134 99
4. Rôle d'Alix dans la biogenèse et la composition des exosomes **102**
4.1. Alix n'est pas nécessaire à la formation des exosomes mais régule leur taille et leur composition protéique 102
4.2. Effet de la déplétion d'Alix sur la composition lipidique 105

Discussion **108**

1. Les exosomes neuronaux se fixent spécifiquement aux neurones **109**

1.1. Suivi des exosomes fluorescents 109

1.2. Spécificité de fixation des exosomes neuronaux 110

1.3. Propagation de la TeNT via les exosomes 112

2. Le miRNome des neurones et de leurs exosomes **112**

2.1. Effet de la stimulation synaptique sur les microARN 112

2.2. Composition en microARN des exosomes 113

2.3. Les microARN les plus abondants dans les exosomes 113

2.4. Les microARN sont sélectivement exportés dans les exosomes 114

2.5. Mécanisme du contrôle de l'export des microARN 115

2.6. Effet des exosomes neuronaux 115

2.7. Système rapporteur 117

3. Rôle d'Alix dans la biogenèse et la composition des exosomes **118**

3.1. Alix n'est pas nécessaire pour la sécrétion des exosomes 118

3.2. Effet de la déplétion d'Alix sur la composition lipidique 119

3.3. Conclusion sur Alix 120

4. Conclusion **122**

Références **123**

Annexe **135**

Avant propos

La communication intercellulaire permet de coordonner de manière harmonieuse l'ensemble des cellules d'un organisme multicellulaire. La physiologie de chaque cellule est régulée par des voies de signalisation intracellulaires activées par des molécules sécrétées ou par contact cellule-cellule. Cependant, un troisième mode de communication, basé sur l'échange de microvésicules appelées « exosomes », a été découvert.

Historiquement, le terme « exosomes » du grec exo « hors de » et soma « corps » a été introduit par Tram et collaborateurs en 1981 pour définir des microvésicules, sécrétées par les cellules dans le milieu extracellulaire. La définition des exosomes telle que nous l'utilisons aujourd'hui, a été décrite par Johnson et collaborateurs, en 1987, suite à des observations en microscopie électronique du trafic intracellulaire du récepteur à la transferrine par des réticulocytes en maturation (Harding & Stahl 1983) (Pan et al. 1985). Les auteurs ont défini les exosomes comme des microvésicules d'origine endosomale, sécrétées dans le milieu extracellulaire après fusion à la membrane plasmique d'un endosome multivésiculé (Johnstone et al. 1987).

Découverts il y a 30 ans, les exosomes ont initialement été décrits comme moyen d'élimination du matériel intracellulaire. Depuis, une nouvelle fonction leur a été attribuée, celle de vecteur dans la communication entre les cellules. En effet, les exosomes contiennent des lipides, des protéines et des ARN capables de modifier la physiologie des cellules receveuses (Colombo et al. 2013) (Kalra et al. 2016).

Dans le système nerveux central, les neurones sont les cellules spécialisées dans la communication. Ils sont connectés entre eux par des zones de contact appelées synapses qui se modifient et s'adaptent suite aux informations reçues. Le laboratoire a montré que les neurones sécrètent des exosomes (Fauré et al. 2006) de manière régulée par l'activité synaptique (Lachenal et al. 2011). L'objectif de mon travail de thèse a porté sur l'étude du rôle des exosomes dans la communication entre les neurones.

Introduction

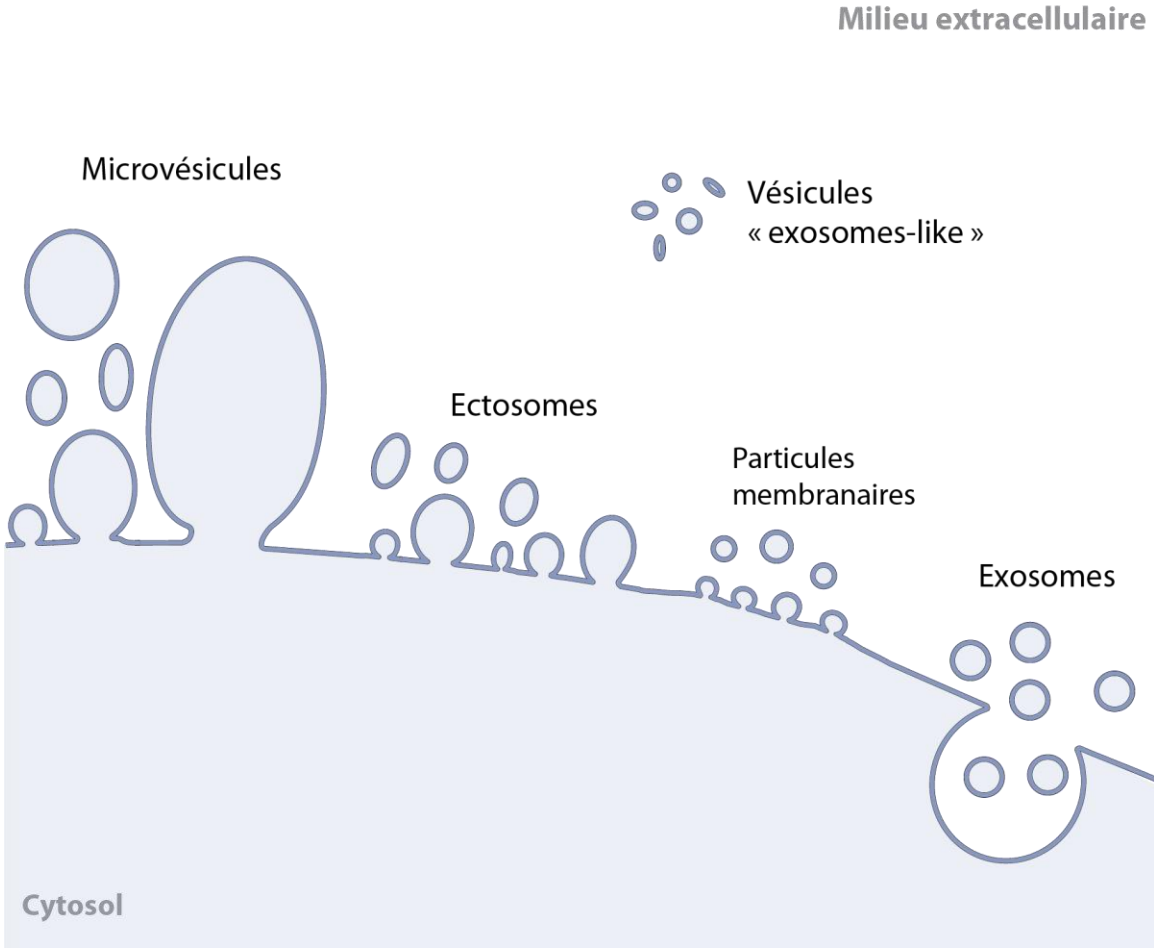


Figure 1 : les cellules sécrètent différents types de vésicules extracellulaires. Alors que les microvésicules, les ectosomes et les particules membranaires sont formés à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique, les exosomes possèdent une origine intracellulaire et sont libérés dans le milieu extracellulaire après fusion à la membrane plasmique d'un endosome multivésiculé. Les vésicules « *exosomes-like* » auraient également une origine intracellulaire dont le compartiment n'est pas encore défini.

1. Les exosomes : nanovésicules d'origine endosomale

Les cellules sécrètent des vésicules dans le milieu extracellulaire (**Figure 1**). Ces vésicules sont délimitées par une bicouche lipidique. Il existe différents type de vésicules extracellulaires dont l'origine, les caractéristiques physiques (taille, densité, sédimentation) et biochimiques varient (**Tableau 1**). Il est possible de distinguer deux classes de vésicules en fonction de leur origine : les vésicules formées à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique et les exosomes qui possèdent une origine intracellulaire.

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires, d'un diamètre compris entre 50 et 100 nm, d'origine endosomale et sécrétées après fusion à la membrane plasmique d'un endosome multivésiculé (Johnstone et al. 1987). Parfois utilisé dans la littérature pour faire référence à l'ensemble des vésicules extracellulaires, le mot « exosome » sera exclusivement utilisé dans ce manuscrit pour référer aux vésicules extracellulaires telles que définies par Johnson et collaborateurs.

Caractéristiques	Exosomes	Microvésicules	Ectosomes	Particules membranaires	Vésicules "exosome-like"	Vésicules apoptotiques
Origine intracellulaire	Endosomes	Membrane plasmique	Membrane plasmique	Membrane plasmique	Compartiment internes ?	ND
Taille	50-100 nm	100-1000 nm	50-200 nm	50-80 nm	20-50 nm	50-500 nm
Densité dans le sucrose	1,13-1,19	ND	ND	1,04-1,07	1,1	1,16-1,28
Sédimentation	100 000 g	10 000 g	160 000-200 000 g	100 000-200 000 g	175 000 g	1 200 g, 10 000 g ou 100 000 g
Composition lipidique	Enichis en cholestérol, sphingomyéline et céramides ; contienent des radeaux lipidiques ; phosphatidylsérine exposée	Phosphatidylsérine exposée	Enrichis en cholestérol et diacylglycérol ; phosphatidylsérine exposée	ND	Ne contiennent pas de radeaux lipidiques	ND
Principaux marqueurs protéiques	Tétraspanines (CD63, CD9), Alix et TSG101	Intégrines, sélectines et CD40 ligand	CR1 et des enzymes protéolitiques ; ne contient pas CD63	Ne contient pas CD63	Récepteur au TNF (TNFR1)	Histones

Tableau 1 : caractéristiques physicochimiques des différents types de vésicules retrouvées dans le milieu extracellulaire. Les vésicules apoptotiques sont retrouvées dans le milieu extracellulaire suite à l'apoptose d'une cellule. ND : non défini. Adapté de (Théry et al. 2009).

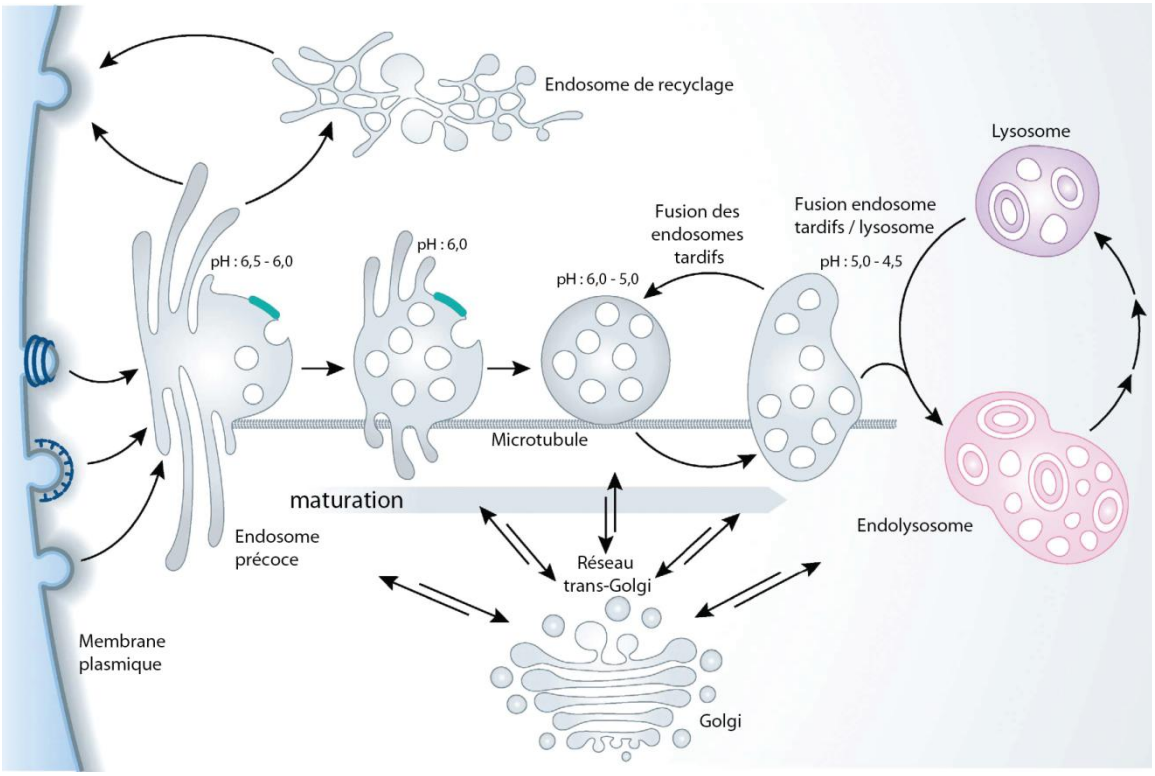


Figure 2 : maturation des compartiments de la voie endolysosomale.. Les vésicules endosomales provenant de la membrane plasmique fusionnent avec les endosomes précoces. Après une accumulation des cargos dans les endosomes précoces, ces derniers sont recyclés à la membrane plasmique (directement ou via des endosomes de recyclage) ou poursuivent la voie endolysosomale. Les endosomes migrent vers l'espace périnucléaire le long des microtubules. La partie vacuolaire des endosomes précoces qui contient des ILV matures fusionnent pour former les endosomes tardifs. La maturation des endosomes est associée avec une augmentation du nombre d'ILV et une diminution du pH luminal. Le lysosome est le compartiment final de la voie de dégradation. Adapté de (Huotari & Helenius 2011)

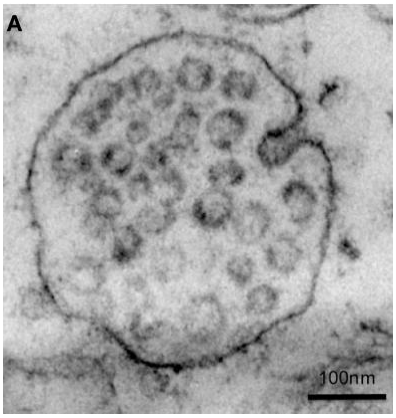


Figure 3 : bourgeonnement d'une vésicule intraluminale dans un endosome multivésiculé (Chivet et al. 2012)**.**

1.1. **Biogenèse des exosomes**

Les exosomes sont issus de la voie endosomale. Le trafic intracellulaire permet de réguler l'état de la membrane plasmique dont la composition résulte d'un équilibre entre l'apport par exocytose et le retrait par endocytose de matériel lipidique et protéique. Il existe deux modes de sécrétion : la sécrétion « constitutive » et la sécrétion « régulée ». Alors que la sécrétion constitutive s'effectue en continu, la sécrétion régulée est, elle, déclenchée par un stimulus.

Une fois endocytées, les molécules de surface atteignent les endosomes précoces où elles sont triées pour être recyclées ou dégradées. Les molécules à recycler sont redirigées vers la membrane plasmique via les endosomes de recyclage. Les molécules à dégrader sont sélectivement regroupées dans des zones de la membrane endosomale qui s'invaginent pour former des vésicules intraluminales (ILV pour i*ntraluminal vesicles*). Ces vésicules s'accumulent dans la lumière des endosomes qui prennent alors le nom d'endosome multivésiculé en référence aux vésicules dont ils sont remplis. Les endosomes multivésiculés (MVE pour *multivesicular endosomes*) vont ensuite fusionner avec les lysosomes. Ce processus conduit à l'hydrolyse des vésicules intraluminales et de leurs cargos (**Figure 2**). Cependant, les MVE peuvent également fusionner avec la membrane plasmique et libérer ainsi, dans le milieu extracellulaire, les vésicules qu'ils contiennent. Les vésicules intraluminales ainsi larguées dans le milieu extracellulaire prennent alors le nom d'exosomes (**Figure 4**).

Les MVE apparaissent en microscopie électronique comme des organelles sphériques caractérisés par une simple membrane extérieure qui entoure un nombre variable de vésicules sphériques ou ellipsoïdales (les ILV) de taille hétérogène entre 50 et 100 nm de diamètre (**Figure 3**). Les MVE ont un diamètre de 250-1000 nm et contiennent en moyenne 24 ILV à l'intérieur de leur lumière (Von Bartheld & Altick 2011). Le diamètre des exosomes est équivalent à celui des ILV dont ils sont originaires. La biogenèse des exosomes repose sur celle des vésicules intraluminales des MVE.

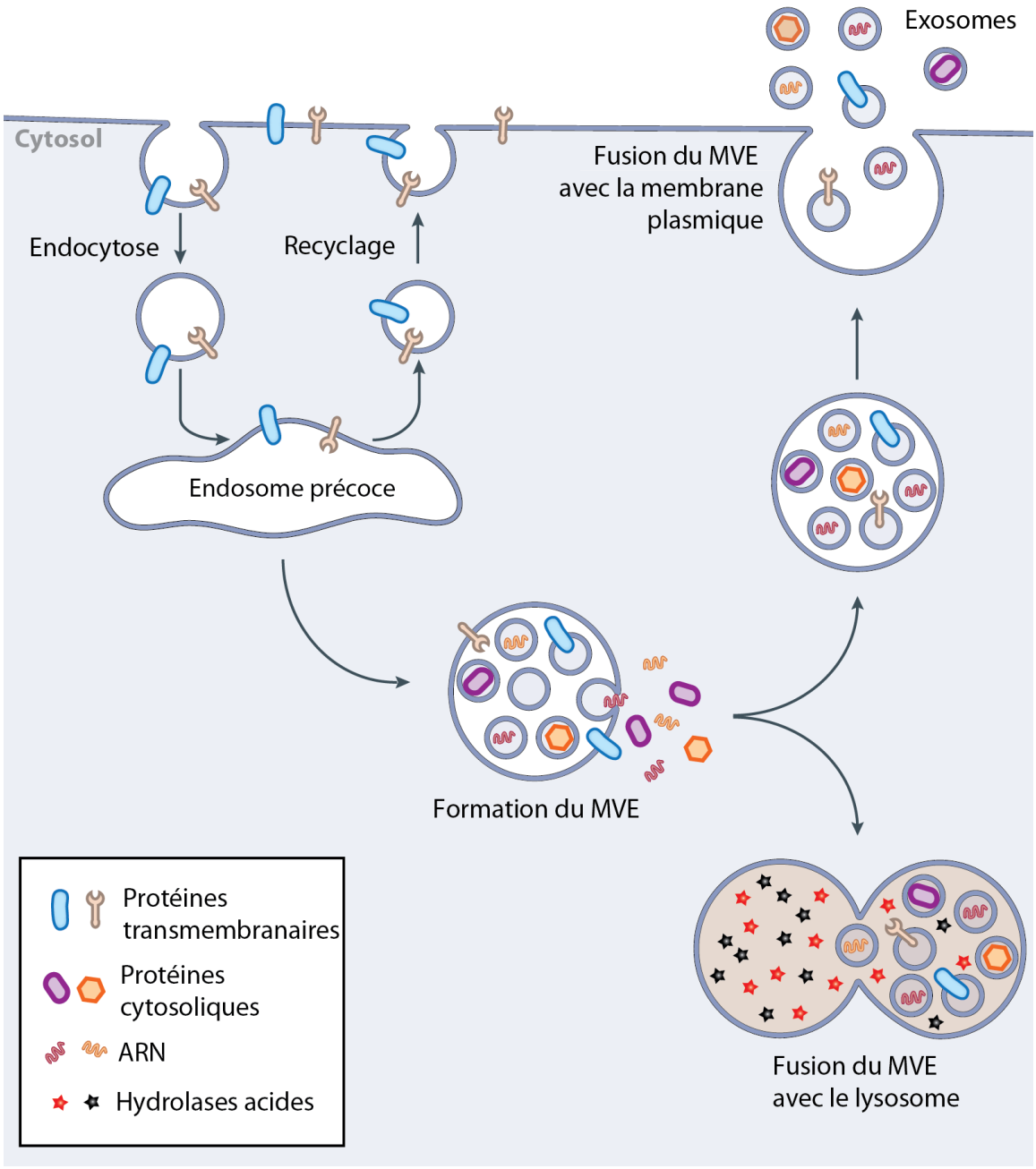


Figure 4 : voie de biosynthèse des exosomes. MVE : endosome multivésiculé

1.1.1. La machinerie ESCRT

Les vésicules intraluminales sont formées à partir d'une courbure négative de la membrane endosomale qui s'invagine dans la lumière de l'endosome. Après fission de la vésicule, celle-ci se retrouve piégée dans l'endosome. La déformation membranaire permettant la formation des ILV est assurée par la machinerie ESCRT *(endosomal sorting complex required for transport)* composée de quatre complexes multiprotéiques : ESCRT-0, I, II et III (**Figure 5**, **Tableau 2**).

Pour la majorité des protéines membranaires étudiées, leur sortie dans les ILV des MVE est affectée par l'ubiquitination. Cette modification post-traductionnelle, nécessitant une cascade enzymatique, aboutit à la fixation covalente d'une ou plusieurs ubiquitine (protéine de 76 acides aminés) sur un ou plusieurs résidus lysine d'une protéine substrat. L'étiquette d'ubiquitine est reconnue par la sous unité HRS (*hepatocyte growth factor (HGF)-regulated tyr-kinase substrate*) du complexe ESCRT-0. Cette interaction initie l'assemblage séquentiel des 4 complexes de la machine ESCRT. ESCRT-0 recrute un des composants d'ESCRT-I, TSG101 (*Tumour Suceptibility Gene 101*), permettant l'assemblage successif des complexes ESCRT-I puis ESCRT-II (composé de Vps22, Vps36 et de deux Vps25). L'assemblage des protéines d'ESCRT-II initie la formation de la vésicule en recrutant la sous-unité CHMP6 (*charged multi-vesicular body protein 6*) du complexe ESCRT-III (**Figure 6**).

ESCRT-III, composé de CHMP2, CHMP3, CHMP4 et CHMP6, est au cœur de la machinerie ESCRT. CHMP6 permet d'amorcer l'assemblage de CHMP4 qui se polymérise pour former un filament dynamique responsable du rapprochement des deux feuillets de la bicouche lipidique et de l'enfermement des cargos dans la vésicule en formation. L'association de CHMP3 et de CHMP2 permet ensuite de bloquer la polymérisation et de recruter l'ATPase Vps4 qui dissocie ESCRT-III. Cette étape est essentielle pour la fission de la vésicule et permet le recyclage de la machinerie ESCRT (Hurley & Hanson 2010) (Williams & Urbé 2007).

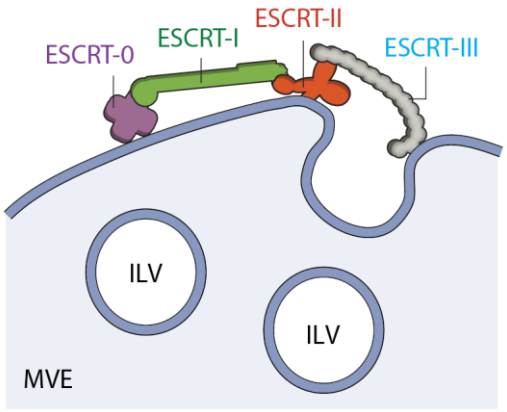


Figure 5 : formation des vésicules intraluminales d'un endosome multivésiculé (MVE). Les vésicules intraluminales (ILV) sont formées à partir d'une courbure négative de la membrane endosomale qui s'invagine dans la lumière de l'endosome. Adapté de (Raiborg & Stenmark 2009).

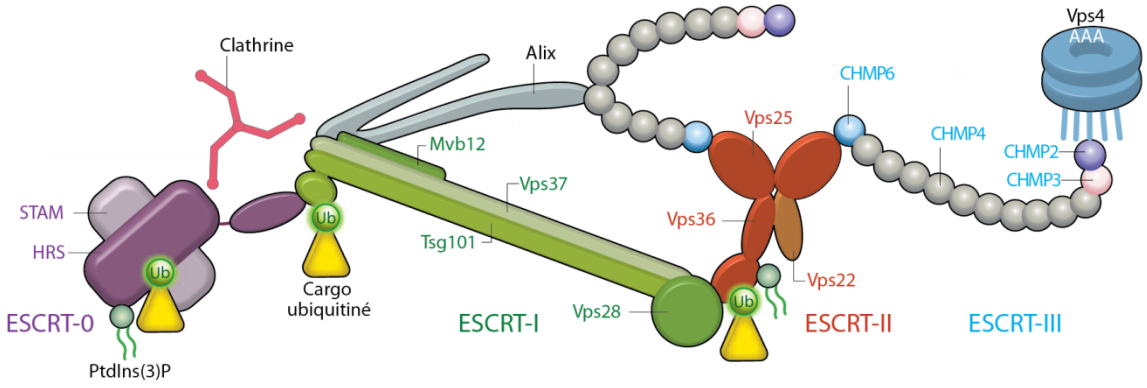


Figure 6 : assemblage et interactions moléculaires de la machinerie ESCRT. Adapté de (Raiborg & Stenmark 2009). Ub : ubiquitine, Pidlns(3)P : phosphatidylinositol-3-phosphate.

Activité ESCRT	Levure	Métazoaires	Rôle biochimique
ESCRT-0			
Regroupement des cargos à internaliser	Vps27	HRS (HGS)	Interaction avec le Pi3P, ESCRT-I, l'ubiquitine et la clathrine
	Hse1	STAM1, STAM2	Ubiquitine
ESCRT-I			
Bourgeonnement de la membrane (avec ESCRT-II)	Vps23	VPS23 (TSG101)	Interaction avec l'ubiquitine et ESCRT-0
	Vps28	VPS28	Interaction avec ESCRT-II
	Vps37	VPS37A, VPS37B, VPS37C, VPS37D	Interaction avec les membranes
	Mvb12	MVB12A, MVBB	Stabilise les oligomères d'ESCRT-I et interaction avec l'ubiquitine
ESCRT-II			
Bourgeonnement de la membrane (avec ESCRT-I)	Vps22	VPS22 (EAP30)	Interaction avec les membranes
	Vps25	VPS25 (EAP20)	Recrute ESCRT-III via l'interaction avec Vps20
	Vps36	VPS36 (EAP45)	Interaction avec les membranes, l'ubiquitine et ESCRT-I
ESCRT-III			
Scission de la membrane	Vps20	VPS20 (CHMP6)	Initie l'assemblage de ESCRT-III et la scission
	Snf7 (Vps32)	SNF7A (CHMP4A), SNFB (CHMP4B), SNFC (CHMP4C)	Principal acteur de la scission membranaire, interaction avec Alix
	Vps24	VPS24 (CHMP3)	Complète la scission membranaire
	Vps2	VPS2A (CHMP2A), VPS2B (CHMP2B)	Recrute Vps4 et initie la dissociation d'ESCRT-III

Tableau 2 : sous-unités de la machinerie ESCRT et fonctions associées. Adapté de (Hurley & Hanson 2010)

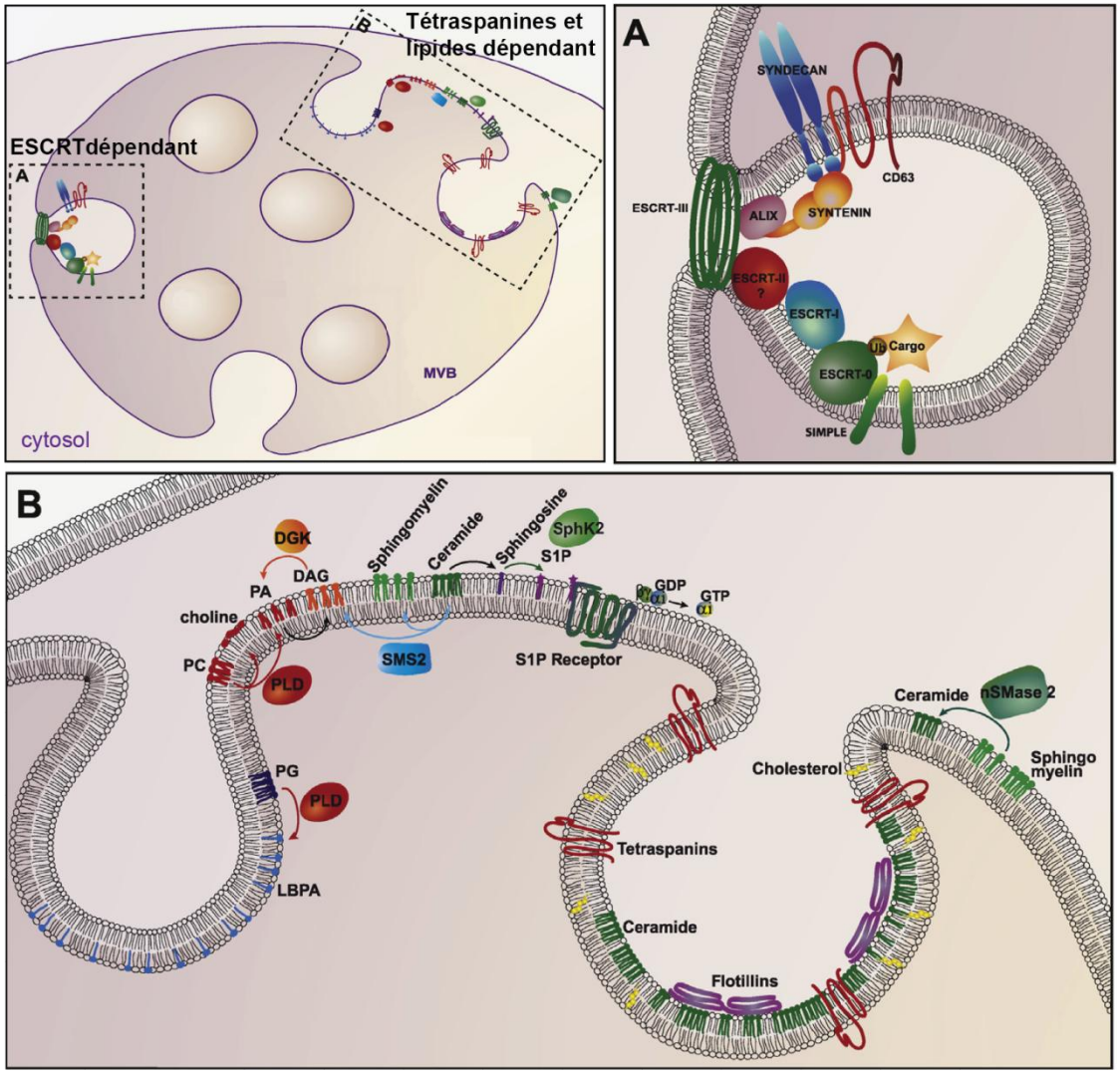


Figure 7 : mécanismes qui contrôlent la sortie des cargos dans les exosomes. (A) La machinerie ESCRT et Alix contrôlent la sortie des protéines ubiquitinées dans les ILV des MVE. Le complexe synténine-syndécane est impliqué dans la sécrétion des exosomes via des interactions spéficifiques avec la machinerie ESCRT. (**B**) Les tétraspanines (CD81, CD9 et CD63) jouent un rôle dans la composition des exososomes de manière indépendante des ESCRT. Différents lipides et enzymes associées contrôlent la sécrétion de ces exosomes. nSMase2 : neutral sphingomyelinase 2; S1P: sphingosine-1-phosphate; SphK2: sphingosine kinase 2; DAG: diacylglycerol; SMS2: sphingomyelin synthase 2; PA: acide phosphatidique ; PC: phosphatidylcholine; PLD: phospholipase D; LBPA: acide lysophosphatidique. Adapté de : (Villarroya-Beltri et al. 2014).

1.1.2. Autres acteurs de la formation des MVE

Cependant, la machinerie ESCRT n'est pas le seul moyen pour former des MVE (**Figure 7**). En effet, des MVE ont été observés dans des cellules déplétées des sous-unités clés des quatre complexes de la machinerie ESCRT : HRS (ESCRT-0), TSG101 (ESCRT-I), VPS22 (ESCRT-II) et CHMP3 (ESCRT-III) (**Figure 6**). Néanmoins, des modifications morphologiques ont été observées dont un élargissement du diamètre des MVE et une hétérogénéité des ILV (Stuffers et al. 2009).

Puisque la formation des MVE est possible en absence de la machinerie ESCRT, quels sont alors les acteurs permettant la déformation membranaire nécessaire à la formation des vésicules intraluminales ?

Une première réponse a été apportée par les travaux de Matsuo et collaborateurs. Les auteurs ont montré que la présence du LBPA (acide lysobisphosphatidique) dans des liposomes induit l'invagination de membrane conduisant à la formation de vésicules à l'intérieur des liposomes. Le LBPA est un lipide seulement présent dans les membranes internes des endosomes tardifs. Sa structure en forme de cône permettrait la déformation membranaire requise pour la formation des ILV (Matsuo et al. 2004).

Quatre ans plus tard, Trajkovic et collaborateurs ont montré le rôle d'un autre lipide dans la sécrétion et la biogenèse des exosomes : le céramide. Le céramide possède, comme le LBPA, une structure conique qui lui permettrait de déformer la membrane pour la formation des ILV. Le céramide est issu du clivage d'une sphingomyéline (SM) en phosphatidylcholine (PC) et céramide (Cer) par une sphingomyélinase (SMase). Dans leur étude, les auteurs ont montré que l'inhibition de la SMase diminue significativement la sécrétion de la protéine protéolipidique PLP (*proteolipid protein*) dans les exosomes purifiés à partir d'une lignée d'oligodendrocytes (Oli-neu). De manière intéressante la PLP est associée aux radeaux lipidiques et sa sortie dans les exosomes n'est pas perturbée par l'inhibition de l'expression des composants de la machinerie ESCRT (TSG101, Vps4) ou d'Alix (voir 1.1.3). Ces données suggèrent que la sortie de PLP dans les exosomes est indépendante des ESCRT mais dépendante des céramides. Une expérience *in vitro* dans laquelle l'ajout d'une SMase provoque la formation de vésicules intraluminales dans des GUV (*giant unilamellar vesicles*) composés de DOPC (dioleoylphosphatidylcholine), de

sphingomyéline (SM) et de cholestérol a confirmé le rôle des céramides dans la formation des MVE (Trajkovic et al. 2008).

Cependant, le rôle des céramides dans la formation des MVE ne semble pas être universel puisque l'inhibition de la SMase n'a pas modifié la sécrétion des exosomes d'une lignée de cellule prostatique (PC-3) (Phuyal et al. 2014).

La machinerie ESCRT n'est donc pas indispensable dans la formation des MVE mais son absence a des conséquences sur la morphologie des ILV et sur leur contenu protéique. Le LBPA et les céramides sont des lipides présents dans des microdomaines membranaires rigides (riches en cholestérol et sphingomyéline (Sobo et al. 2007) appelés radeaux lipidiques (rafts) présents sur la membrane endosomale. Leur structure conique leur permettrait d'induire spontanément une courbure négative de la membrane de l'endosome aboutissant à la formation des ILV. D'autres acteurs comme les tétraspanines interviennent dans la biogenèse des MVE (Andreu & Yáñez-Mó 2014). Les rôles respectifs des acteurs liés à la formation des MVE dépendants ou indépendants des ESCRT ne sont pas clairement définis. Il est possible que les ILV soient formées en combinant la déformation membranaire induite par les lipides avec la spécificité des complexes protéiques ESCRT (Babst 2011). Il est également possible que les mécanismes de formation ESCRT dépendant et indépendant coexistent pour former des ILV au sein d'un même MVE (Edgar et al. 2014).

1.1.3. Alix au pays des endosomes multivésiculés

Alix (*Alg2 interacting protein X*), également connue sous le nom d'AIP1 (*apoptosis interacting protein 1*) et de PDCD6IP (*programmed cell death 6 interacting protein*), est une protéine cytosolique ubiquitaire de 868 acides aminés. Alix a d'abord été mise en évidence en 1999 (Missotten et al. 1999) comme partenaire de la calci-protéine impliquée dans l'apoptose dépendante du calcium Alg2 (*apoptosis linked gene 2*). Alix est composée d'un domaine N-terminal (domaine Bro1), d'un domaine central (V domaine) qui lui permet de se dimériser et d'un domaine C-terminal riche en proline (domaine PRD pour *prolin rich domain*). On sait aujourd'hui qu'Alix est une protéine adaptatrice possédant de nombreux partenaires et est impliquée dans de nombreux processus cellulaires (**Figure 8**) (Odorizzi 2006).

Parmi les partenaires d'Alix se trouvent deux sous-unités de la machinerie ESCRT. Une des fonctions des ESCRT est de déformer la membrane endosomale pour former des ILV (voir 1.1.1). Alix interagit via son domaine N-terminal Bro1 avec la sous-unité CHMP4 du complexe ESCRT-III (Katoh et al. 2003). Son domaine C-terminal lui permet d'interagir avec la sous-unité TSG101 du complexe ESCRT I (Strack et al. 2003).

Un autre partenaire d'Alix est impliqué dans la déformation membranaire requise pour former les ILV. Alix interagi avec le LBPA via son domaine N-terminal Bro1. Le LBPA est un lipide dont la structure en cône lui permet de déformer la membrane pour former des ILV. Il a été montré que la formation de vésicules à l'intérieur de liposome par le LBPA est régulée par Alix (Matsuo et al. 2004).

Plusieurs études se sont intéressées au rôle d'Alix dans la biogenèse et la composition des exosomes mais son implication est mal comprise. Dans une lignée d'oligodendrocytes (Oli-neu), la formation des exosomes est indépendante d'Alix mais dépendante du céramide (voir 1.1.2) (Trajkovic et al. 2008).

Alix a été impliquée dans la sortie dans les ILV des MVE du récepteur aux protéines G PAR1 (*protease activation receptor 1*). Les auteurs ont montré l'interaction directe entre le V domaine d'Alix et le motif (YPX_3L) situé dans la boucle intracellulaire du récepteur PAR1. La sortie de PAR1 activé est indépendante de son ubiquitination. Les auteurs proposent qu'Alix recruterait le complexe ESCRT-III via son interaction avec CHMP4. Alix permettrait donc la sortie de cargo dans les vésicules intraluminales des MVE, indépendamment de l'ubiquitine mais dépendamment de la machinerie ESCRT (Dores et al. 2012).

En revanche, dans une lignée de cellules cancéreuses (MCF-7), Baietti et collaborateurs ont montré qu'Alix est un régulateur de la formation des exosomes via le complexe syndécane-synténine. Le syndécane est un protéoglycane contenant des chaines de sulfate d'héparane dont le domaine intracellulaire fixe la protéine cytosolique synténine qui se fixe à Alix. Les auteurs ont montré que la surexpression de la synténine conduit à une augmentation de la formation des exosomes syndécane, synténine, Alix, CD63, et HSP70 positifs. La diminution de la syndécane, de la synténine ou d'Alix diminue la formation de ces mêmes exosomes. De plus, la diminution de l'expression de TSG101 ou CHMP4 diminue la sécrétion des exosomes.

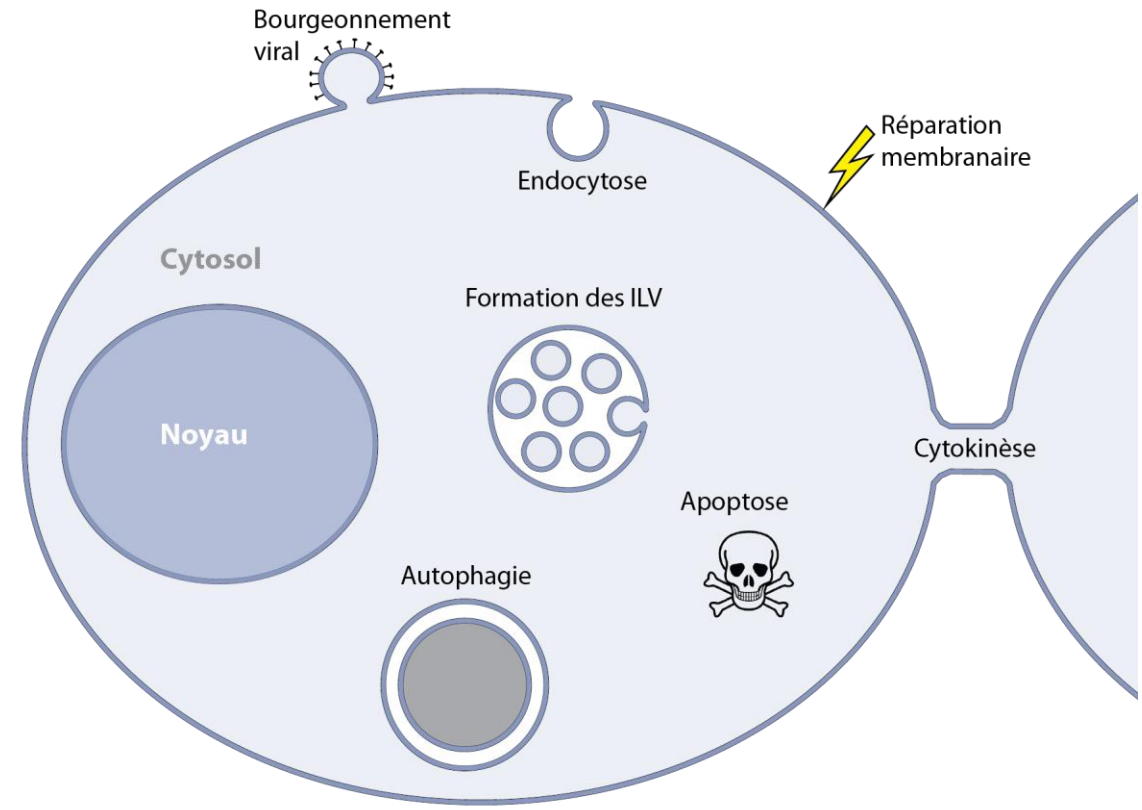


Figure 8 : processus cellulaires impliquant la protéine Alix.

La formation des ILV est probablement dépendante du recrutement des ESCRT via Alix au sein du complexe syndécane-synténine-Alix (Baietti et al. 2012).

Il a été montré que la formation des exosomes synténine-Alix est dépendante de l'activation de la petite GTPase ARF6 (*ADP ribosylation factor 6*) et de son effecteur la phospholipase D2. Ces derniers contrôlent la formation de vésicules intraluminales dans les MVE (Ghossoud 2013). Il est important de remarquer que ces modifications n'affectent pas les exosomes portant CD9, CD81 et flotilline. Enfin, la voie syndécane-synténine-Alix est régulée par la modification des sulfates d'héparane sur la syndécane par une héparanase. Cette enzyme qui dégrade les polymères de sulfate d'héparane stimule la production des exosomes syndécane-synténine-Alix (Roucourt et al. 2015).

La diminution de l'expression d'Alix dans les HeLa diminue aussi la sécrétion des exosomes CD63, HSC70 positifs et augmente les exosomes CMH II positifs. Les auteurs ont également montré que l'absence d'Alix conduit à une augmentation de la proportion de vésicules avec un diamètre supérieur à 100 nm (Colombo et al. 2013).

Plus récemment, Murrow et collaborateurs ont montré que la déplétion d'Alix diminue la sécrétion des exosomes (HSC70 positifs) de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF). Dans leur étude, les auteurs ont également montré que la sécrétion des exosomes de MEF requiert l'interaction entre les protéines impliquées dans l'autophagie ATG12 et ATG3. Les auteurs suggèrent que l'interaction entre Alix et le complexe ATG12-ATG3 pourrait réguler la sécrétion des exosomes (Murrow et al. 2015).

1.1.4. Autres fonctions d'Alix

La protéine Alix est également impliquée dans de nombreux processus cellulaires (**Figure 8**). Parmi eux, Alix a tout d'abord été décrite dans la mort cellulaire programmée. Une augmentation de son expression a été observée, *in vivo*, au niveau de l'hippocampe et du striatum suite à traitement induisant la mort cellulaire (Hemming et al. 2004) (Blum et al. 2004). De plus, il a été montré *in vivo* que la surexpression d'Alix est suffisante pour induire la mort cellulaire de manière dépendante de son interaction avec Alg2 et que la surexpression de sa partie C-terminale (dépourvue des sites d'interaction avec TSG-101 et CHMP4) est capable de bloquer l'apoptose (Trioulier et al. 2004) (Mahul-Mellier et al. 2006). Puis, Alix a été décrite dans l'induction de l'apoptose via l'activation des caspases 8 et 9 (Mahul-Mellier et al. 2008)(Strappazzon

et al. 2010). La fonction apoptotique d'Alix est donc dépendante de son interaction avec la machinerie ESCRT.

Les virus piratent les machineries moléculaires des cellules hôtes afin de répliquer leur matériel génétique et de produire les protéines virales. Certains virus utilisent la machinerie ESCRT pour déformer la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule pour produire les virions. Il a été montré que le recrutement des ESCRT permettant le bourgeonnement viral est médié par Alix via son interaction avec CHMP4 (Zhou et al. 2010).

Alix a également été impliquée dans la réparation membranaire. Il a été montré qu'Alg2 est la première protéine recrutée au niveau de la blessure et ce de manière dépendante du calcium. Puis Alg2 recrute Alix qui à son tour recrute les ESCRT pour permettre la réparation membranaire (Scheffer et al. 2014).

La cytokinèse est la dernière étape de la division cellulaire et permet la scission du pont membranaire entre les deux cellules filles. Alix est également impliquée dans la cytokinèse puisqu'elle permet, avec TSG101, le recrutement du complexe ESCRT-III qui assure la scission membranaire (Morita et al. 2007).

L'autophagie est un mécanisme d'autolyse permettant à la cellule de dégrader des composants de son cytoplasme vers ses lysosomes. Les travaux réalisées aux laboratoires ont montré que contrairement aux ESCRT, Alix n'est pas impliquée dans l'autophagie induite (Petiot et al. 2008). Cependant, une étude récente suggère un rôle d'Alix dans l'autophagie basale via son interaction avec le complexe ATG12-ATG3 (Murrow et al. 2015).

Enfin, Alix a également été décrite dans l'endocytose. La déplétion d'Alix par des RNAsi augmente faiblement l'endocytose du récepteur à l'EGF et à l'inverse, la surexpression d'Alix diminue son endocytose (Schmidt et al. 2004). Récemment, les travaux de thèse de V. Mercier au laboratoire ont montré que l'endocytose indépendante de la clathrine (CIE) est inhibée dans les cellules ko Alix alors que l'endocytose médiée par la clathrine n'est pas perturbée. Le contrôle de la CIE par Alix est effectué en partenariat avec les endophilines (Mercier et al. 2016).

1.2. **Sécrétion des exosomes**

La libération des exosomes dans le milieu extracellulaire requiert le transport du MVE à la membrane plasmique, son amarrage et la fusion des deux membranes.

Les Rab qui sont des petites GTPases (*guanosine triphosphatases*) contrôlent différentes étapes du trafic des vésicules intracellulaires (**Figure 9**. Certaines Rab ont un effet sur la sécrétion des exosomes : Rab7 (Baietti et al. 2012), Rab11 (Savina et al. 2005), Rab35 (Hsu et al. 2010), Rab2b, Rab5a, Rab9a, Rab27a et Rab27b (Ostrowski 2010). Les protéines SNARE (*SNAP (soluble NSF attachment protein) receptor)* sont des acteurs majeurs des phénomènes d'exocytose. L'association des v-SNARE (v pour *vésicular*) situées sur la vésicule avec les t-SNARE (t pour *target*) sur la membrane cible permet l'arrimage et la fusion des vésicules à la membrane plasmique de manière dépendante du calcium. Deux v-SNARE participent à la sécrétion des exosomes : la synaptobrévine YKT6 (Gross et al. 2012) et Vamp7 (*vesicle associated membrane protein 7*) (Fader et al. 2009).

Le calcium intracellulaire régule la fusion des MVE à la membrane plasmique conduisant à la sécrétion des exosomes (Savina et al. 2005), (Savina et al. 2003). La sécrétion des exosomes à partir de cultures primaires de neurones est stimulée par une dépolarisation (Fauré et al. 2006) ou une stimulation de l'activité synaptique (Lachenal et al. 2011). Plus communément, les ionophores du calcium ont été utilisés pour stimuler la sécrétion des exosomes dans différents types cellulaires dont des cellules d'une lignée d'érythroleucémie K562 (Savina et al. 2003), des oligodendrocytes (Krämer-Albers et al. 2007), des cellules dendritiques (Montecalvo et al. 2012) et des mastocytes (Valadi et al. 2007). La stimulation de la sécrétion des exosomes est abolie en présence d'un chélateur du calcium (BAPTA-AM) (Savina et al. 2003) (Lachenal et al. 2011).

Le pH du milieu extracellulaire semble également jouer un rôle dans la sécrétion des exosome. Parolini et collaborateurs ont observé une augmentation de la sécrétion des exosomes de mélanome métastatiques à pH acide (pH 6,0) par rapport à un pH physiologique (Parolini et al. 2009).

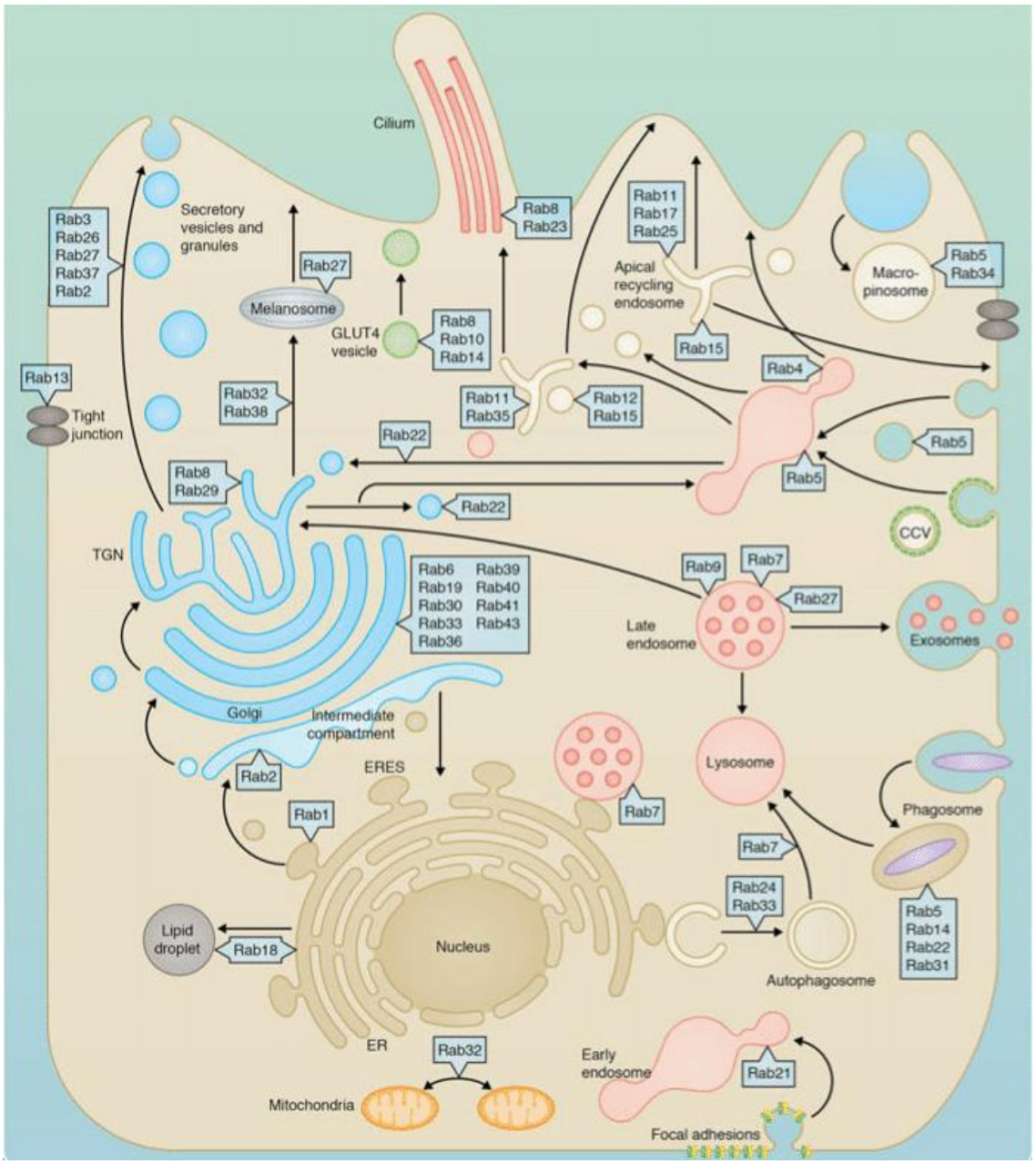


Figure 9 : fonctions des GTPases Rab dans une cellule (Zhen & Stenmark 2015)**.**

1.3. Composition biochimique des exosomes

De nombreuses études se sont intéressées à la composition biochimique des exosomes (et des microvésicules en général). Deux bases de données contributives ont été créées pour regrouper les résultats des études sur la composition en lipide, protéine et en ARN des vésicules extracellulaires : Vesiclepedia (http://microvesicles.org), (Kalra et al. 2012) et EVpedia. (http://evpedia.info) (Kim et al. 2013).

1.3.1. Lipides

La phosphatidylcholine (PC) est le lipide le plus abondant dans les membranes cellulaires puisqu'elle représente la moitié des lipides d'une cellule (45-55%). Vient ensuite la phophatidyl-éthanolamine (PE) qui représente la moitié des lipides restants (15-25% du total). Les autres lipides composant la membrane biologique sont : le cholestérol (10-20%), le phosphatidylinositol (PI, 10-15%), la phosphatidylsérine (PS, 5-10%), la sphingomyéline (SM, 5-10%), l'acide phosphatidique (PA, 1-2%), les glycosphingolipides (2-5%), la cardiolipide (uniquement présent dans les membranes mitochondriales, 2-5%) et le phosphatidylglycérol <1%), (Vance 2015). Les différentes membranes sont principalement composées des mêmes classes lipidiques mais leur abondance relative varie d'un organite à l'autre. De plus, les phospholipides peuvent être répartis inégalement de part et d'autre de la membrane. Par exemple, dans la membrane plasmique, la phophatidyl-éthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS) sont très enrichies dans le feuillet interne alors que la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) sont enrichies dans le feuillet externe.

Les membranes cellulaires sont des structures dynamiques dans lesquelles les molécules diffusent latéralement. Cependant, plusieurs facteurs affectent la fluidité membranaire : la longueur des chaînes hydrocarbonées (plus elles sont longues plus la membrane est rigide), le nombre de doubles liaisons (qui créent un coude dans la chaîne carbonée ce qui l'éloigne de l'axe vertical et augmente la fluidité membranaire), la nature des têtes polaires (par exemple la phosphatidylcholine a une tête plus large que la phosphatidyl-éthanolamine, ce qui éloigne les phospholipides et fluidifie la membrane) et la quantité de cholestérol qui a tendance à rigidifier la membrane.

Certains lipides sont des messagers secondaires et interviennent dans la signalisation intracellulaire. Par exemple, la phospholipase D (PLD) hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) et génère une choline et un acide phosphatidique (PA), un important second messager intracellulaire.

Connaître la composition lipidique des membranes des exosomes est donc primordial pour appréhender leur rôle dans la communication intercellulaire. Des analyses lipidomiques ont révélé une composition lipidique type des exosomes (**Figure 10**). Ainsi, la membrane des exosomes est caractérisée par un enrichissement en sphingomyéline (SM), en céramide (Cer), en cholestérol, en phosphatidylsérine (PS), en phosphatidylinositol (PI), en acide phosphatidique (PA) et un appauvrissement en phosphatidylcholine (PC) (Trajkovic et al. 2008) (Wubbolts et al. 2003) (Laulagnier, Motta, et al. 2004) (Llorente et al. 2013). Les exosomes peuvent contenir (Laulagnier, Motta, et al. 2004) (Denzer et al. 2000) ou non (Wubbolts et al. 2003) du LBPA.

De plus, contrairement à la membrane plasmique, la phosphatidyl-éthanolamine (PE) est distribuée symétriquement entre les deux feuillets de la membrane des exosomes (Laulagnier, Motta, et al. 2004). Il a également été montré une augmentation des lipides saturés dans les exosomes (Trajkovic et al. 2008) (Llorente et al. 2013) (Laulagnier, Motta, et al. 2004).

La composition lipidique des exosomes diminue la fluidité de leur membrane (Laulagnier, Motta, et al. 2004). Leur rigidité membranaire confèrerait aux exosomes une stabilité dans le milieu extracellulaire et la capacité de transport de matériel entre les cellules. Les exosomes semblent aussi assez stables dans les fluides corporels pour assurer la communication entre les cellules à travers l'organisme.

De plus, il a été montré que les exosomes contiennent des enzymes catalytiquement actives comme, par exemple, la phospholipase D2 (PLD2) (Laulagnier, Grand, et al. 2004). La phosphatidylcholine (PC) des exosomes pourrait être hydrolysée par la phospholipase D2 (PLD2) et générer de l'acide phosphatidique (PA). Ce dernier, pourrait modifier la signalisation intracellulaire de la cellule receveuse et conforter ainsi l'effet biologique des exosomes.

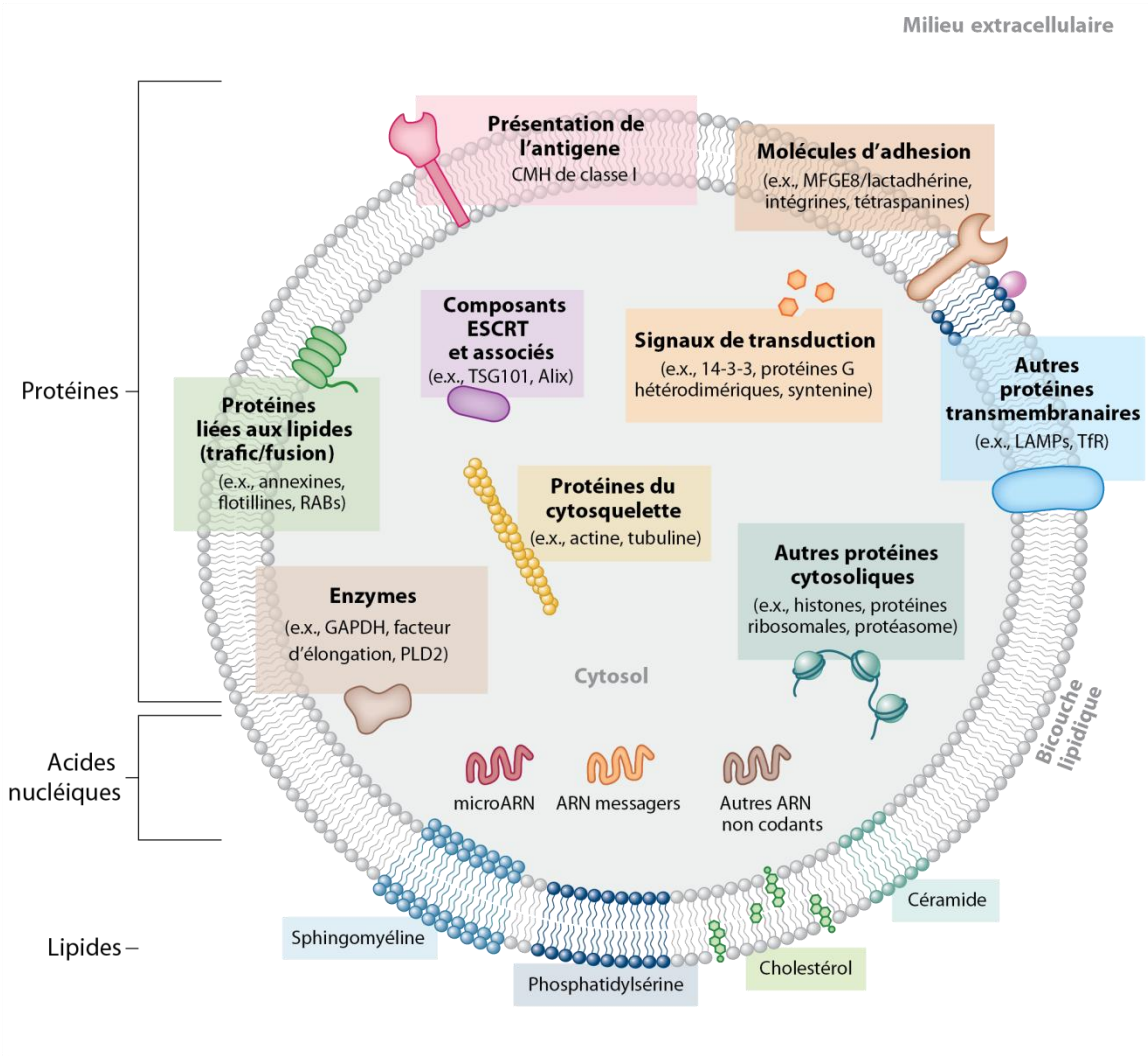


Figure 10 : composition biochimique d'un exosome type. Adapté de (Colombo et al. 2014). CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, MFGE8 : *milk fat globule-EGF factor 8 protein*, LAMP : *lysosome-associated membrane glycoprotein*, TfR : *transferrin receptor*, PLD2 : phospholipase D2, GAPDH : *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.*

1.3.2. Protéines

Connaître la composition protéique des exosomes est indispensable pour comprendre leur rôle et leur effet dans la communication intracellulaire.

En 2009, Théry et collaborateurs ont croisé les résultats de 15 études portant sur la composition protéique des exosomes et ont établi une composition en protéines (membranaire et cytosolique) typique des exosomes (Théry et al. 2009).

Un exosome type contient (**Figure 10**):

- Des molécules d'adhésion (MFGE8/lactadhérines, intégrines)
- Des tétraspanines (CD63, CD81,CD9)
- Des protéines associées aux radeaux lipidiques (flotilline)
- Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1
- Des protéines de signalisation intracellulaire (sous unité α des protéines G, protéine14-3-3, synténine)
- Des molécules de la machinerie ESCRT (TSG101) ou associées (Alix)
- Des protéines du trafic membranaire (Rab, annexine)
- Des chaperonnes (HSP70 et 90)
- Des molécules du cytosquelette ou associées au cytosquelette (actine, tubuline)
- Des enzymes impliquées dans la synthèse protéique (facteurs d'élongation)
- Des enzymes du métabolisme cellulaire (GAPDH)

Les exosomes contiennent des protéines issues de la membrane plasmique, de la voie endocytaire et du cytosol mais ne contiennent pas de protéines nucléaires, mitochondriales, ni de protéines du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. Les protéines retrouvées dans les exosomes ne sont donc pas exportées aléatoirement.

Certaines de ces protéines sont enrichies dans les exosomes et sont considérées comme des marqueurs. Il s'agit par exemple de la protéine Alix ou de la tétraspanine CD63.

Cependant, la composition en protéines des exosomes dépend du type cellulaire et de l'état physiologique de la cellule d'origine. Par exemple, la molécule d'adhésion L1Cam est un marqueur des exosomes neuronaux (Fauré et al. 2006).

Une partie de la composition protéique des exosomes s'expliquerait par leur origine endosomale. Pour le reste, il est très probable que ces protéines soient exportées spécifiquement pour jouer un rôle dans la communication intracellulaire. Par exemple, certaines molécules transmembranaires (molécules d'adhésion entre autres) permettraient la fixation des exosomes sur les cellules réceptrices et ainsi déclencheraient des cascades de signalisation intracellulaire. Des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire, une fois libérées dans la cellule réceptrice, pourraient modifier la physiologie de la cellule receveuse. Les analyses sur la composition en protéines des exosomes sont donc au cœur des études sur le rôle des exosomes dans la communication intracellulaire.

1.3.3. Acides nucléiques

Connaître la composition des exosomes en acides nucléiques est important pour appréhender leur rôle dans la communication entre les cellules. C'est en 2007 que, pour la première fois, la présence d'ARN a été mise en évidence dans les exosomes. En effet, Valadi et collaborateurs ont découvert des ARN messagers (ARNm) et des microARN (miR) dans les exosomes de mastocytes murins et humains. Leur étude est aujourd'hui incontournable puisqu'ils ont également prouvé que les ARN présents dans les exosomes pouvaient modifier l'expression génique dans des cellules receveuses (Valadi et al. 2007). Depuis, la plupart des études décrivent l'absence d'ADN et la présence d'ARN dont des ARN messagers, des microARN et autres ARN non codants (**Figure 10**) (Nolte-'t Hoen et al. 2012).

L'absence d'ARN ribosomiques (18S et 28S) est un bon indicateur de la qualité de la purification des exosomes. Un traitement des exosomes à la RNase permet d'éliminer les ARN contaminants (dont les ARN 18S et 28S) tout en conservant les ARN contenus dans les exosomes et donc protégés de l'enzyme (Valadi et al. 2007).

Les microARN sont des ARN courts (22 nucléotides) non codants impliqués dans la régulation post-transcriptionelle (voir paragraphe 3.1). Ce sont de puissants régulateurs géniques puisqu'un microARN peut inhibiter la traduction ou entraîner la dégradation de nombreux ARNm différents. Il a été montré que les microARN véhiculés dans les exosomes sont capables de réguler la traduction d'un ARNm donné dans la cellule receveuse (Montecalvo et al. 2012). Le transfert direct de microARN

entre cellules via les exosomes permettrait donc à une cellule de contrôler à distance l'expression génique d'une autre cellule.

Cette hypothèse est renforcée par l'idée que les microARN ne sont pas exportés dans les exosomes de manière aléatoire (Janas et al. 2015). La composition en microARN des exosomes n'est pas le reflet de la composition de la cellule. Un mécanisme du contrôle de l'export des microARN dans les exosomes commun entre les différents types cellulaires pourrait exister (Guduric-Fuchs et al. 2012). Plusieurs mécanismes possibles impliqués dans la sélection des microARN exportés dans les exosomes ont été décrits (Zhang et al. 2015).

Impliqués dans la formation des ILV (Trajkovic et al. 2008), les céramides sembleraient intervenir dans l'export des microARN dans les exosomes. Kosaka et collaborateurs ont montré en 2010 que la quantité de microARN retrouvée dans les exosomes de cellules HEK293 est corrélée avec la biosynthèse des céramides : une surexpression de la nSMase2 augmente le nombre de microARN et à l'inverse, une inhibition (GW4869) ou une diminution de l'expression (ARNsi) de la nSMase2 diminue la quantité de microARN (Kosaka et al. 2010).

Un autre mécanisme du contrôle des microARN exportés dans les exosomes a été mis en évidence en 2013. Les auteurs ont montré que la sumoylation de la protéine hnRNPA2B1 (*heterogenous nuclear ribonucleoproteins A2B1)* contrôle le chargement dans les exosomes de lymphocytes T des microARN qui contiennent un motif ARN spécifique appelé « EXO-motif » (Villarroya-Beltri et al. 2013). La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui aboutit à une liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (s*mall ubiquitin-like modifier*) sur une lysine d'une protéine substrat. Les hnRNPA1 et hnRNPC peuvent également fixer des microARN contenus dans les exosomes via un motif encore inconnu mais pourraient également contrôler l'export des microARN dans les exosomes (Villarroya-Beltri et al. 2013).

Un mécanisme de régulation de l'export des microARN dans les exosomes basé non pas sur la séquence du microARN mature mais sur des modifications post-transcriptionnelles a été décrit en 2014. A partir de lymphocytes B, Koppers-Lalic et collaborateurs ont montré que les isoformes de microARN 3' adénylés sont enrichis dans les cellules alors que les isoformes de microARN 3' uridylés sont enrichis dans les exosomes (Koppers-Lalic et al. 2014).

La sélection des microARN exportés dans les exosomes pourrait aussi être expliquée par l'interaction du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex* , voir paragraphe 3.1) avec la machinerie ESCRT lors de la formation des ILV (Siomi & Siomi 2009). La présence des protéines Ago2 et GW182 du complexe RISC dans les exosomes renforce cette hypothèse (Gibbings et al. 2009).

La protéine Alix serait également impliquée dans l'export des microARN dans les exosomes. Récemment, Iavello et collaborateurs ont analysé le contenu en microARN d'exosomes d'hépatocytes en absence de la protéine Alix et ont observé une diminution drastique des microARN exportés dans les exosomes. L'absence d'Alix diminue également la présence de la protéine Argonaute 2 (voir paragraphe 3.1) dans les exosomes (Iavello et al. 2016). L'interaction Alix-Ago2 pourrait être responsable de l'export des microARN dans les exosomes (Gibbings et al. 2012).

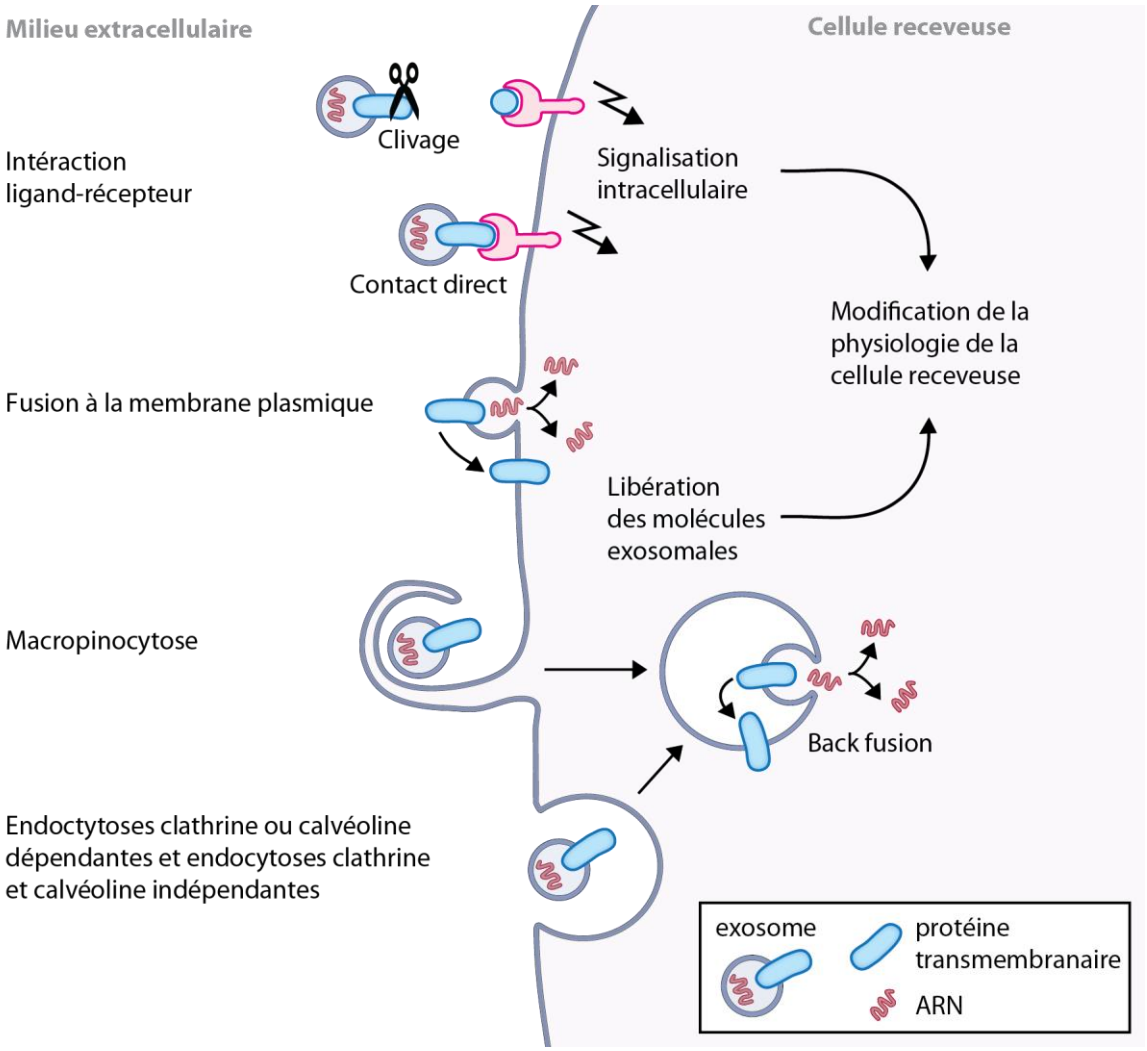


Figure 11 : fixation et recapture des exosomes par une cellule receveuse.

1.4. Fixation des exosomes sur une cellule cible

1.4.1. Interaction ligand-récepteur

Dans le cas où la communication exosomale est médiée par les molécules présentes sur la surface des exosomes, il s'agit d'une interaction de type ligand-récepteur. Le ligand exosomal se fixe spécifiquement sur le récepteur situé sur la membrane plasmique de la cellule réceptrice et induit l'activation de voies de signalisation intracellulaire. Le ligand exosomal peut également être clivé et libéré pour agir comme une cytokine soluble (**Figure 11**).

Une étude sur les exosomes purifiés à partir de placenta humain a montré que ces exosomes induisaient l'apoptose d'une lignée de lymphocyte T (Jurkat) et de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) via des messagers de mort présents à leur surface : le TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand)* et le ligand Fas (FasL) (Stenqvist et al. 2013). FasL et TRAIL sont des protéines transmembranaires dont le domaine extracellulaire (ou extra-exosome) contient des sites de clivage pour des métalloprotéases qui génèrent des protéines solubles. Les formes solubles du FasL et de TRAIL peuvent être produites à partir de ces exosomes purifiés (Stenqvist et al. 2013). La forme soluble du FasL est moins apoptotique que le FasL membranaire. La présence de métalloprotéases dans le milieu pourrait cliver les FasL membranaires des exosomes et ainsi modérer l'effet du FasL exosomal. L'effet des exosomes pourrait donc dépendre de leur environnement.

1.4.2. Fusion

Dans le cas où la communication exosomale est médiée par les molécules présentes à l'intérieur des exosomes, il est nécessaire que la membrane exosomale fusionne avec la membrane cellulaire afin de déverser le contenu de l'exosome dans le cytoplasme de la cellule receveuse. La membrane exosomale peut directement fusionner avec la membrane plasmique ou fusionner avec la membrane endosomale après endocytose de l'exosome. Les molécules exosomales solubles se retrouvent donc dans le cytoplasme de la cellule receveuse. Les molécules exosomales membranaires sont incorporées dans la membrane plasmique ou dans les membranes endosomales de la cellule receveuse (**Figure 11**). C'est ainsi que les molécules exosomales (lipides, protéines et ARN) peuvent modifier la physiologie de la cellule receveuse.

L'observation de la fusion entre l'exosome et la membrane cellulaire en microscopie optique à fluorescence a été montrée via l'utilisation de la Rhodamine B Octadécyle (R18). Cette sonde lipophile ne fluoresce qu'à faible concentration (*self-quenching* à forte concentration). C'est pourquoi, les exosomes sont préalablement marqués avec le R18 à forte concentration et lorsque l'exosome fusionne, la sonde R18 est diluée dans la membrane de la cellule receveuse et devient fluorescente. C'est ainsi que Parolini et collaborateurs ont mis en évidence la fusion à la membrane plasmique et intracellulaire des exosomes de mélanome métastatique avec ces mêmes cellules (Parolini et al. 2009). Les exosomes peuvent donc fusionner avec la membrane de la cellule receveuse et ainsi déverser leur contenu dans son cytoplasme.

1.4.3. Endocytose

Différents types d'endocytose existent en fonction des acteurs moléculaires impliqués (**Figure 12**). L'utilisation ou non du manteau de clathrine pour former la vésicule d'endocytose permet une discrimination de l'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine. L'endocytose dépendante de la clathrine est également dépendante de la dynamine pour la fission vésiculaire. L'endocytose indépendante de la clathrine regroupe un ensemble vaste de mécanismes d'endocytose et serait régulée par le cytosquelette d'actine et les microdomaines lipidiques membranaires riches en cholestérol. Cet ensemble comprend l'endocytose dépendante des cavéoles (dynamine-dépendante), la macropinocytose, l'endocytose flotilline-dépendante, la voie CLIC/GEEC (*CLathrin-Independant Carrier/GPI Early Compartment*), la voie Arf6 (*ADP ribosylation factor 6*), la voie du récepteur à l'interleukine 2 (dynamine-dépendante), la voie médiée par les endophilines ainsi que la phagocytose (réservée aux cellules spécialisées).

Plusieurs études ont observé l'endocytose des exosomes mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas toujours les mêmes. Par exemple, Tian et collaborateurs ont montré que l'endocytose des exosomes de cellules cancéreuses surrénales (PC-12), par ces mêmes cellules, passait par une macropinocytose et une endocytose dépendante de la clathrine (Tian et al. 2014). En revanche, Svensson et collaborateurs ont conclu que les exosomes de glioblastome (U87) étaient endocytés par un mécanisme indépendant de la clathrine mais dépendant des radeaux lipidiques (Svensson et al. 2013).

Il est possible que le mode d'entrée des exosomes dépende des types cellulaires, de l'environnement, de la maturité ou encore de l'activation de la cellule receveuse. Il est aussi possible que les exosomes utilisent plusieurs voies d'endocytose différentes comme le font certains virus (Mercer & Helenius 2009).

Concernant la dynamique du trafic intracellulaire des exosomes, les premiers éléments sont apportés par une étude de microscopie fluorescente en temps réel suivie d'un traçage individuel des exosomes. Dans cette étude, les auteurs ont analysé la vitesse et le sens de déplacement de chaque exosome fluorescent sur la membrane et dans la cellule (exosomes et cellules de prostate PC-3). Les auteurs ont conclu que les exosomes se fixent sur la membrane plasmique via un récepteur et sont endocytés dans des vésicules transportées le long du cytosquelette (Tian et al. 2013).

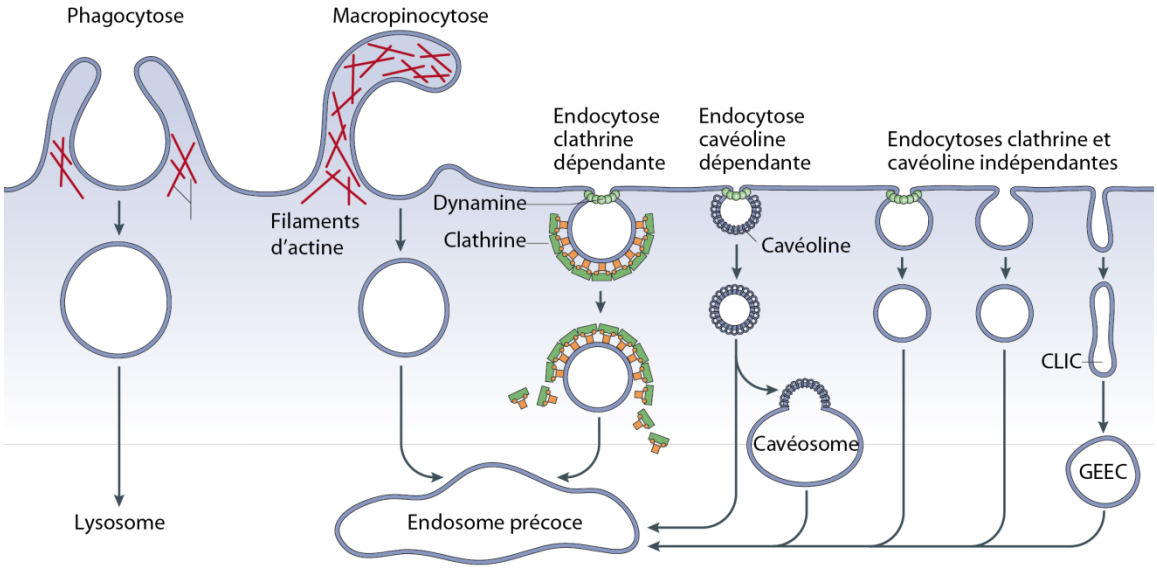


Figure 12 : les voies d'endocytose. Adapté de (Mayor & Pagano 2007). CLIC/GEEC : *clathrin-independent carrier/GPI early compartment.*

2. Communication exosomale dans le système nerveux central

2.1. La transmission synaptique

Dans le cerveau, les neurones communiquent entre eux via les synapses. La synapse chimique est une zone de contact entre deux neurones constituée d'une terminaison pré-synaptique et d'un élément post-synaptique séparé par une fente synaptique. L'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison pré-synaptique déclenche la fusion des vésicules synaptiques conduisant à l'exocytose des neurotransmetteurs. Le neurotransmetteur excitateur le plus repandu est le glutamate et le principale neurotransmetteur inhibiteur est le GABA (acide gamma-aminobutyrique).

La plupart des synapses excitatrices sont établies entre un bouton axonal (pré-synaptique) et une protubérance dendritique appelée une épine dendritique (post-synaptique). Il existe deux classes de récepteurs au glutamate : métabotropiques et ionotropiques. Les récepteurs métabotropiques sont des récepteurs couplés aux protéines G dont la fixation du glutamate déclenche une transduction du signal via les protéines G. Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs canaux qui permettent le passage d'ions à travers la membrane plasmique.

La transmission synaptique excitatrice est principalement assurée par les récepteurs ionotropiques AMPA (α-amino -3-hydroxy -5-méthyl -4-proprionate) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate). La fixation du glutamate sur les récepteurs AMPA induit l'ouverture du canal et permet l'entrée sélective de Na^+ provoquant une dépolarisation membranaire. Lorsque la dépolarisation membranaire est importante l'ion Mg^{2+}, qui bloque le canal des récepteurs NMDA au potentiel de repos, est éjecté. La fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA en absence de Mg^{2+} induit une entré de Ca^{2+} (**Figure 13**). Le calcium active ensuite des voies de signalisation qui régulent la plasticité synaptique, c'est à dire, la capacité des synapses à adapter l'efficacité de la transmission synaptique en fonction de leur activité. La plasticité synaptique peut induire un renforcement (potentialisation) ou une diminution (dépression) de l'efficacité de la transmission synaptique. Ces événements peuvent être transitoires ou maintenu dans le temps. Ainsi, la potentialisation à long terme (LTP) est le maintien dans le temps d'un renforcement de l'efficacité synaptique. Il se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs AMPA et par des modifications morphologiques comme une augmentation du volume de l'épine dendritique (**Figure 14**).

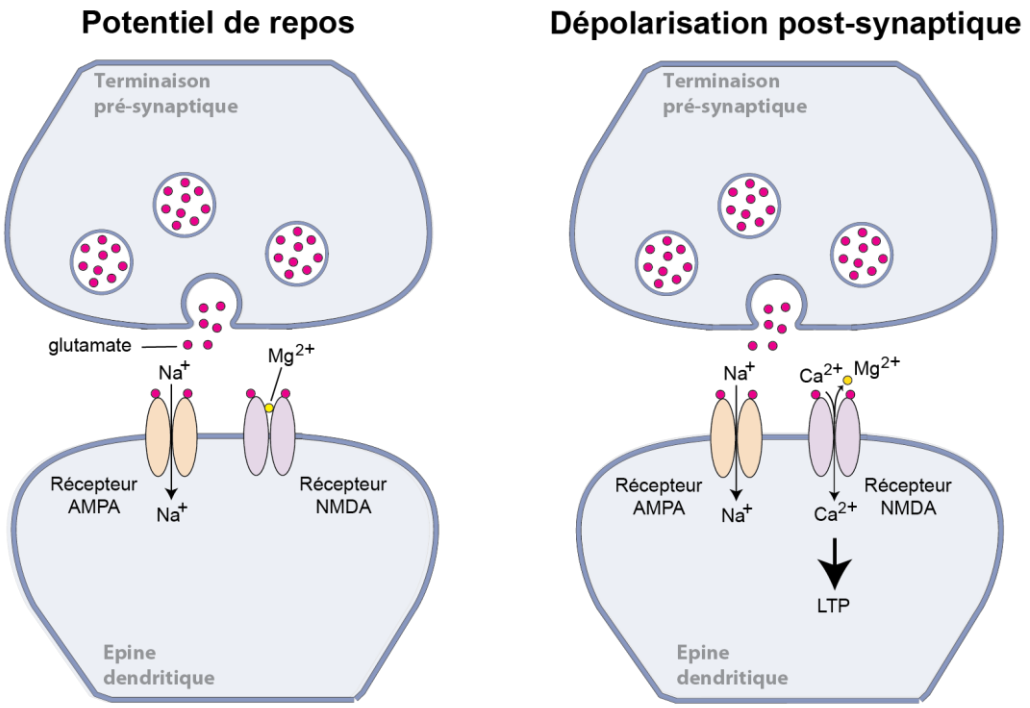


Figure 13 : transmission synaptique basale et induction de la LTP dépendante des récepteurs NMDA. Représentation schématique des mécanismes qui conduisent à l'entrée de Ca2+ par les récepteurs NMDA post-synaptiques.

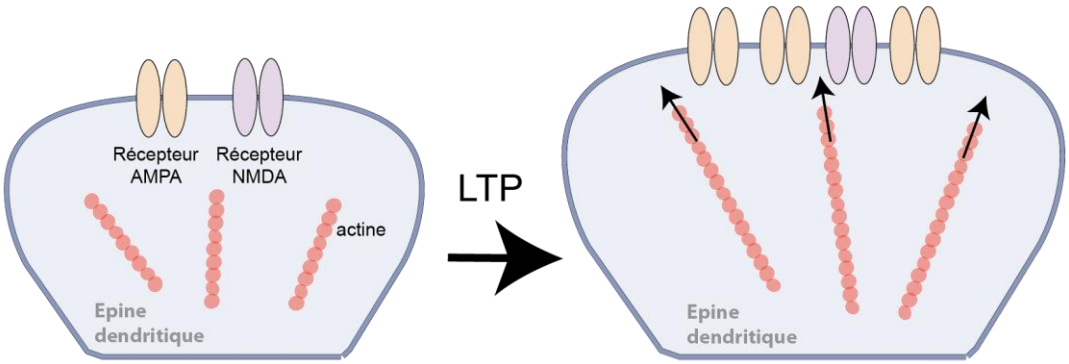


Figure 14 : les phénomènes de plasticité synaptique s'accompagnent de modifications morphologiques au niveau des épines dendritiques. Le renforcement de l'efficacité synaptique se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs AMPA et une augmentation du volume de l'épine dendritique.

2.2. **Les exosomes neuronaux**

In vitro, tous les types cellulaires du système nerveux central sécrètent des exosomes : des exosomes ont été purifiés à partir du surnageant de culture d'astrocytes (Taylor et al. 2007), d'oligodendrocytes (Krämer-Albers et al. 2007), de microglie (Potolicchio et al. 2005) et de neurones (Fauré et al. 2006). Une analyse protéomique des exosomes purifiés à partir de liquide céphalorachidien humain a révélé la présence de protéines marqueurs des neurones renforçant l'hypothèse d'une sécrétion des exosomes *in vivo* chez l'homme (Chiasserini et al. 2014).

Concernant les exosomes neuronaux, il est important de distinguer les exosomes produits à partir de lignées cellulaires neuronales (N2a, SH-SY5Y, GT1-7 ou encore les cellules PC12) de ceux purifiés à partir de cultures primaires de neurones. La sécrétion des exosomes neuronaux pouvant être stimulée, il faut également tenir compte du type de sécrétion (constitutive *versus* stimulée).

En 2006, J. Fauré et ses collaborateurs ont pour la première fois mis en évidence au sein du laboratoire la sécrétion d'exosomes par des neurones. Les exosomes avaient été purifiés à partir du surnageant de cultures primaires de neurones corticaux au bout de 9 jours de culture (sécrétion constitutive). Les exosomes neuronaux (positifs pour Alix, TSG101 et flotilline) contiennent des protéines neuronales telles que la molécule d'adhésion L1 Cam et la protéine prion PrP. Ils ont également observé la présence de sous unité GluA2/3 des récepteurs AMPA et l'absence de sous-unités des récepteurs NMDA. Enfin, les auteurs ont découvert que la sécrétion des exosomes neuronaux est régulée par la dépolarisation de la membrane (Fauré et al. 2006).

Puis en 2011, les travaux de G. Lachenal et collaborateurs, ont permis d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de régulation de la sécrétion des exosomes neuronaux. Les auteurs ont utilisé des cultures primaires de neurones corticaux matures (15 jours de culture) et ont prouvé que la sécrétion des exosomes neuronaux est régulée par le calcium. En effet, un traitement des neurones avec un ionophore du calcium (ionomycine) qui augmente la concentration du calcium intracellulaire provoque une libération massive des exosomes neuronaux (positifs pour Alix, flotilline et L1Cam). Cette stimulation de la sécrétion des exosomes est abolie en présence d'un chélateur du calcium (BAPTA-AM). Les auteurs ont ensuite étudié le lien entre l'activité synaptique et la sécrétion des exosomes.

Les cultures primaires de neurones corticaux contiennent des neurones excitateurs mais aussi des neurones inhibiteurs. Un traitement des cultures avec des antagonistes des récepteurs GABA (bicuculline ou picrotoxine) permet de bloquer l'activité inhibitrice des neurones et par conséquent stimule l'activité des synapses glutamatergiques. En utilisant un traitement à la bicuculline ou à la picrotoxine, les auteurs ont découvert que la sécrétion des exosomes neuronaux est stimulée par l'activité synaptique excitatrice. Cette stimulation de sécrétion des exosomes est abolie en présente des antagonistes des récepteurs AMPA (CNQX) et des récepteurs NMDA activé (MK801). (Lachenal et al. 2011)

2.3. **Effet des exosomes neuronaux**

En 2013, un effet des exosomes neuronaux a été montré pour la première fois. Des exosomes ont été purifiés à partir de cultures primaires de neurones corticaux après 5 à 8 jours de cultures (sécrétion constitutive) et incubés sur des cultures primaires d'astrocytes. Après 48 h d'incubation, les auteurs ont observés une augmentation significative du taux d'expression du transporteur au glutamate GLT1 présents sur les astrocytes. Les auteurs ont ensuite montré que le miR-124-3p (ou miR-124a) contenu dans les exosomes neuronaux régule l'expression de GLT1. En effet, cette augmentation, abolie en présence d'un oligo anti-sens, est spécifique au miR-124-3p. L'effet du miR-124-3p sur l'expression de GLT1 serait indirecte et le ou les intermédiaires n'ont pas encore été identifiés (Morel et al. 2013). Leur étude montre pour la première fois un effet des exosomes neuronaux. Les exosomes permettent donc la communication entre les neurones et les astrocytes, renforçant l'hypothèse du rôle des exosomes dans la communication intercellulaire dans le cerveau et l'importance des microARN.

2.4. **Effet des exosomes de neuroblastomes**

Une autre étude, publiée en 2014, s'est intéressé aux exosomes neuronaux. Contrairement aux études citées précédemment, ces travaux ont été effectués à partir d'une lignée cellulaire humaine de neuroblastome (SH-SY5Y) différenciés en neurones par un traitement à l'acide *trans* rétinoïque. Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'une dépolarisation membranaire régule l'expression de certains microARN dans les

neurites. Ils ont également montré que les microARN dont l'expression est diminuée après stimulation sont retrouvés dans les exosomes des neurones (Goldi et al. 2014).

Les exosomes neuronaux auraient également un rôle dans la régulation de l'élimination des synapses (*synaptic pruning*) via leur effet sur la microglie. Bahrini et collaborateurs ont utilisé des exosomes purifiés à partir d'une lignée cellulaire PC12 différenciée en neurone par un traitement au facteur de croissance neuronal (NGF) (*neuronal growth factor*). La sécrétion des exosomes de PC12 différenciées a été stimulée par une dépolarisation membranaire. Les auteurs ont montré que ces exosomes stimulaient l'expression du facteur C3 du système du complément dans une lignée cellulaire de microglie (MG6). Il a ensuite été montré que l'activation de la microglie par les exosomes provoquait l'élimination des neurites via un mécanisme inconnu (Bahrini et al. 2015). Cette étude montre que les exosomes neuronaux communiquent avec la microglie pour réguler les connections synaptiques.

En 2015, Goncalves et collaborateur se sont intéressés au rôle thérapeutique des exosomes neuronaux suite à une blessure de la moelle épinière. Dans le système nerveux central, la régénération axonale est inhibée par une absence de facteur de croissance neuronal et une prolifération des cellules gliales. PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) est le principal régulateur négatif de cette régénération neuronale. Il a été montré que le traitement avec un agoniste du récepteur β de l'acide rétinoïque (RARβ) permettait une récupération sensorielle et motrice après une blessure de la moelle épinière. Les auteurs ont montré que cet agoniste augmentait la sécrétion de PTEN dans les exosomes neuronaux et ces exosomes enrichis en PTEN inhibaient la prolifération des astrocytes via le transfert de PTEN des neurones aux astrocytes (Goncalves et al. 2015). Les exosomes neuronaux pourraient améliorer la régénération axonale dans le système nerveux central à la manière des exosomes de cellules de Schwann qui améliorent la régénération des axones dans le système nerveux périphérique (Lopez-Verrilli et al. 2013).

2.5. **Effet des exosomes de cellule gliales sur les neurones**

Dans le système nerveux central, les oligodendrocytes sont les cellules qui forment la gaine de myéline entourant les axones des neurones. La formation et le maintien de cette unité structurale requiert une communication entre les

oligodendrocytes et les neurones. L'hypothèse d'une communication entre ces deux types cellulaires via les exosomes est renforcée par plusieurs observations.

Comme les neurones, les oligodendrocytes possèdent les récepteurs au glutamate AMPA et NMDA. Frühbeis et collaborateurs ont démontré que l'activation de ces récepteurs stimule la sécrétion des exosomes de cultures primaires d'oligodendrocytes. Ces mêmes auteurs ont également montré que l'activité synaptique glutamatergique des neurones corticaux, induite par une dépolarisation membranaire ou un traitement à la bicuculline, stimule la sécrétion des exosomes d'oligodendrocytes. L'utilisation d'inhibiteurs a montré que la stimulation de la sécrétion des exosomes est régulée par l'activation des récepteurs au NMDA des oligodendrocytes. Ces exosomes marqués au PKH67 ont été incubés sur des cultures des différents types cellulaires du système nerveux central et leur internalisation a été mesurée. Les exosomes d'oligodendrocytes ont été internalisés par 2% des oligodendrocytes et 20% des neurones (Frühbeis et al. 2013). Ces données suggèrent que les exosomes relargués par les oligodendrocytes ne sont pas destinés à leur cellule d'origine mais aux neurones. Par la suite, les mêmes auteurs ont démontré que les exosomes d'oligodendrocytes ont un effet protecteur sur les neurones soumis à un stress oxydatif ou à une privation de nutriments (milieu de culture sans B27) (Frühbeis et al. 2013).

Puis, en 2014, Fröhlich et collaborateurs ont montré qu'un traitement de neurones avec des exosomes d'oligodendrocytes augmente l'activité électrique spontanée des neurones mais désynchronise les réseaux neuronaux. Les auteurs ont également observé une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription CREB, d'Akt, de GSK3α/β et de la JNK suggérant une activation par les exosomes d'oligodendrocytes des voies de signalisation intracellulaire activant la survie cellulaire dans les neurones. De manière beaucoup plus étonnante encore, ils ont montré une augmentation de l'expression de la protéine protéolipidique PLP supposée spécifique aux oligodendrocytes dans les neurones. Leur interprétation est que l'ARNm de PLP a été délivré dans les neurones par les exosomes d'oligodendrocytes et ainsi traduit dans les neurones (Fröhlich et al. 2014).

2.6. **Les exosomes comme nouvelle voie de communication entre les neurones (Annexe 1).**

L'article présenté en Annexe est une revue publiée en 2013 dans le journal *Biochemical Society Transactions* dans laquelle j'apparais comme deuxième auteur. Cet article présente l'hypothèse des exosomes comme une nouvelle voie de communication entre les neurones et comme vecteur dans la propagation des maladies neurodégénératives.

3. Les microARN et les neurones

Les microARN sont des ARN courts (22 nucléotides) non codants impliqués dans la régulation post-transcriptionelle. Les microARN se fixent généralement sur la partie non transcrite de l'extrémité 3' (3'UTR, *untranslated region*) d'un ARN messager cible et conduisent à l'inhibition de sa traduction. Un microARN peut théoriquement réguler l'expression de plus d'une centaine d'ARN messagers et un ARN messager peut être régulé par plusieurs microARN.

3.1. **Biogenèse et effet des microARN**

Les gènes codant pour les microARN sont situés dans le génome. Beaucoup de ces gènes sont non codants pour des protéines mais dans certains cas, la séquence codant pour le microARN est située à l'intérieur d'intron ou de régions non traduites de gènes codants pour les protéines. Les gènes des microARN sont transcrits par l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et parfois par l'ARN polymérase III (ARN Pol III).

Bien que la plupart des promoteurs des gènes des microARN n'aient pas été caractérisés en détail, certains exemples ont montré qu'ils étaient régulés par les mêmes mécanismes de régulation (facteurs de transcription et régulation épigénétiques) que ceux impliqués dans la régulation de la transcription des gènes codants pour des protéines. Après la transcription, le transcrit appelé « pri-microARN » subit plusieurs étapes de maturation.

Le pri-microARN est un long ARN (1 kb) possédant une coiffe et une queue polyadénylée. Sa structure secondaire comporte une tige (ARN double brin) de 30 à 35 paires de base (pb) (contenant les séquences des microARN matures), une boucle terminale et de l'ARN simple brin aux extrémités 5' et 3'. La première étape de maturation du pri-microARN est un clivage dans la tige par l'ARNase III Drosha avec l'aide de son cofacteur DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8*) (**Figure 15**). Ce clivage produit un ARN en épingle à cheveux (*hairpin*) d'environ 65 nucléotides de long qui est appelé « pré-microARN ».

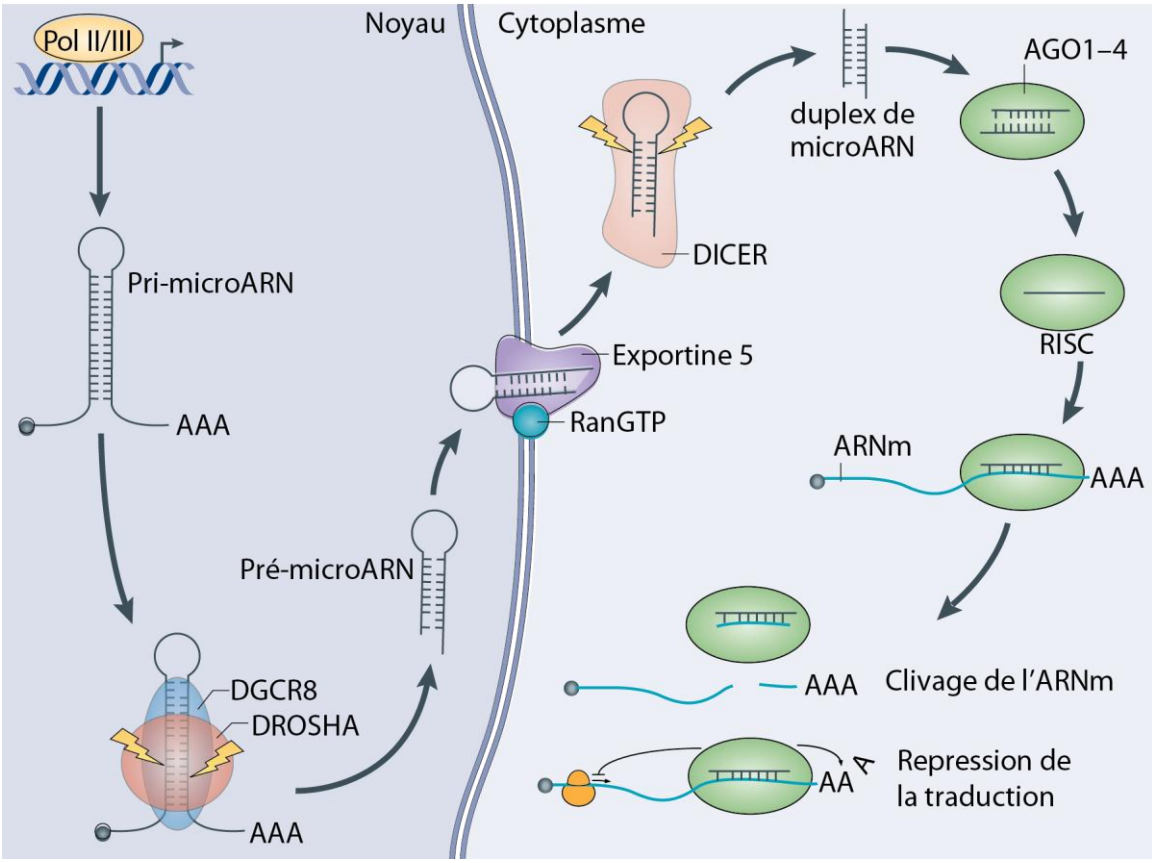


Figure 15 : biogenèse et effet des microARN. Adapté de (Lin & Gregory 2015)

Le pré-microARN est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme à l'aide de l'exportine 5 (Ran GTP-ase). Dès son arrivée dans le cytoplasme, le pré-microARN est clivé par Dicer (une autre RNAse III) près de la boucle terminale, créant un ARN duplex (double brin) court (22 nucléotides) composé des microARN matures appariés. Un de ces deux microARN est souvent plus actif biologiquement que l'autre qui est alors considéré comme le brin « passager ».

L'ARN duplex court (microARN/microARN*) interagit ensuite avec une des protéines de la famille Argonaute (Ago1-4) pour former, avec des protéines chaperonnes (HSC70 et HSP90), le complexe « pré-RISC » (*RNA-induced silencing complex*). Rapidement, le brin passager est éjecté pour générer le complexe RISC mature associé aux protéines GW182, MOV10 et FRMP (*fragile X mental retardation protein*). L'ARN messager cible est chargé dans le complexe RISC via sa séquence cible spécifique du microARN. Le domaine du côté 5' du miR, généralement situé entre les nucléotides 2 et 7, est indispensable pour la reconnaissance de la cible et a été appelée « *microRNA seed* ». Les nucléotides suivants (en particulier le nucléotide 8 et de façon moins importante les nucléotides 13-16) contribuent aussi à l'appariement du miR avec sa cible. Via le RISC, les microARN agissent selon deux modes : l'inhibition de la traduction de l'ARNm (via la dissociation du facteur eIF4F) ou sa déadénylation et par conséquent sa dégradation (recrutement de déadénylases) (Fabian & Sonenberg 2012).

3.2. **Nomenclature**

Une base de données appelée miRBase (http://www.mirbase.org/) recense tous les microARN connus. Dans sa dernière version (miRBase V21, juin 2014), 35828 microARN matures sont référencés dans 223 espèces, dont 2588 microARN chez l'humain, 1915 microARN chez la souris (*Mus musculus*) et 765 microARN chez le rat (*Rattus norvegicus*). La classification des microARN n'est pas encore bien définie mais il est admis que les microARN possédant une séquence identique entre les nucléotides 2 et 8 appartiennent à la même famille.

La nomenclature des gènes codant pour les microARN est assez complexe. Initialement, les gènes ont été nommés en fonction du phénotype (exemple du premier microARN découvert chez *Caenorhabditis elegans* en 1993 : le lin-4) puis un numéro leur a été attribué (c'est pourquoi l'homologue du lin-4 chez les autres espèces est le miR-125).

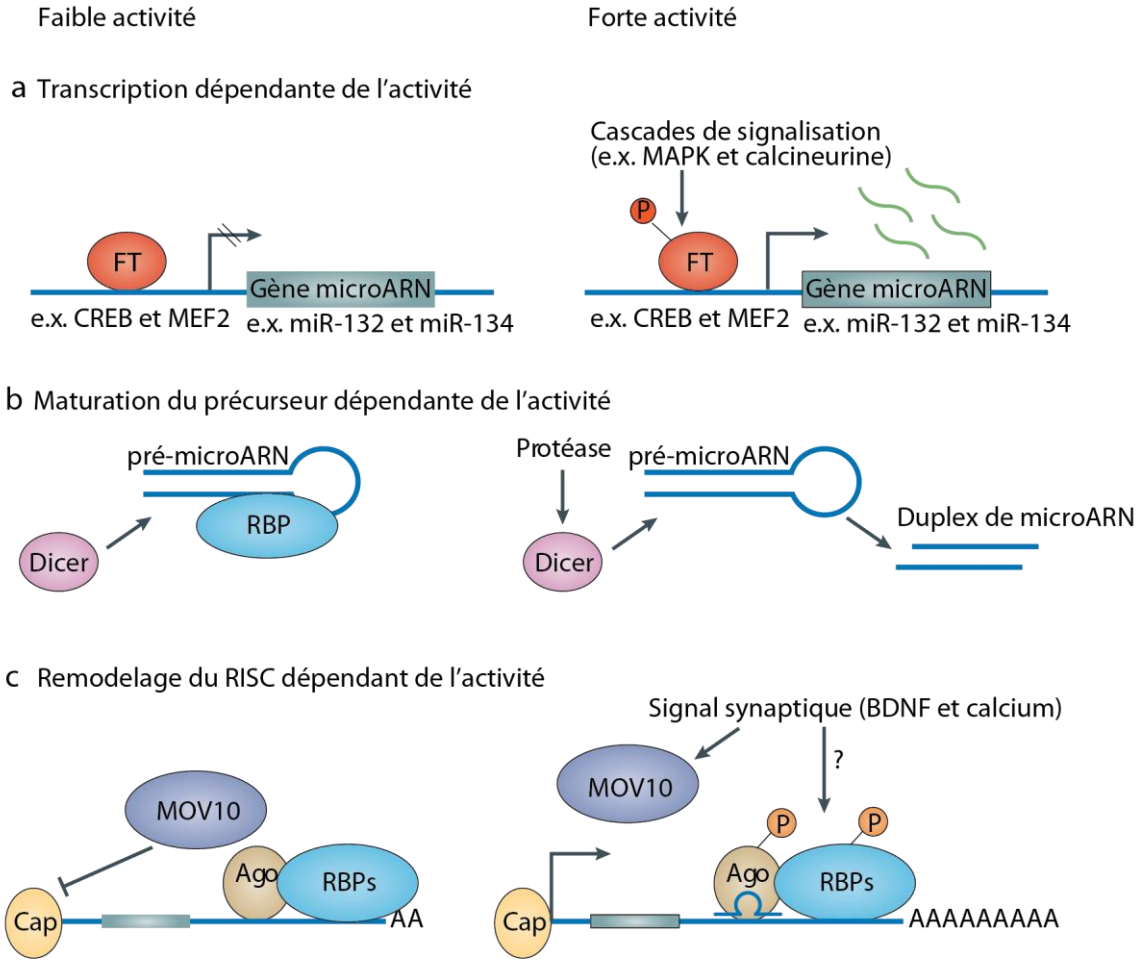


Figure 16 : régulation des microARN par l'activité neuronale. FT : facteur de transcription, CREB : *cAMP response element binding protein*, MEF2 : *myocyte enhancer factor 2*, RBP : *RNA-binding protein*, exemple de RBP ; FMR1 : *fragile X mental retardation protein.* Adapté de (Schratt 2009).

Les gènes codants pour des microARN de la même famille sont indiqués avec une lettre (par exemple : miR-125a et miR-125b). Si un microARN mature est généré à partir de plusieurs régions chromosomiques (locus) séparées, alors un chiffre est ajouté à la fin du nom du microARN (par exemple : miR-125b-1 et miR-124b-2).

Chaque locus produit deux microARN matures : un à partir de l'extrémité 5' et l'autre à partir de l'extrémité 3' du microARN précurseur (par exemple : miR-125b-5p et miR-125b-2-3p). Enfin, un préfixe de trois ou quatre lettres est utilisé pour préciser l'espèce (par exemple : rno-miR-125b-5p chez le rat *Rattus norvégicus*).

3.3. **Régulation des microARN par l'activité neuronale**

La régulation de l'expression génique par l'activité neuronale permet aux neurones d'adapter leur connectivité aux changements dans leur environnement. L'activité neuronale influence de nombreux régulateurs synaptiques dont les microARN.

Le premier niveau de régulation des microARN a lieu au niveau de la transcription (**Figure 16a**). Il a été montré que le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), une neurotrophine qui contrôle la plasticité synaptique (Leal 2015), régule l'expression du miR-132 via l'activation du facteur de transcription CREB (*cAMP response element binding protein*) (Vo et al. 2005). Fiore et collaborateurs ont également décrit l'effet régulateur du BDNF sur l'expression de microARN. Ils ont observé que le BDNF, tout comme une dépolarisation membranaire, augmente l'expression du groupe de miR379-410 (dont le miR-134). Cette régulation dépendante de l'activité neuronale est médiée par le facteur de transcription Mef2 (*myocyte enhancer factor 2*) (Fiore et al. 2009).

L'activité neuronale permet également de réguler les microARN via la régulation des enzymes impliquées dans la biogenèse des microARN (**Figure 16b**). L'enzyme Dicer inactive est présente dans l'épine dendritique et est enrichie dans la densité post-synaptique. Il a été montré que le clivage de Dicer par la calpaïne 1 est activé par la stimulation des récepteurs NMDA dans des tranches d'hippocampe ou par un traitement calcique de synaptoneurosomes. Mais surtout, le clivage de Dicer par la calpaïne stimule son activité RNAse III (Lugli et al. 2005). La calpaïne est une protéase dépendante du calcium, activée suite à la stimulation des récepteurs au NMDA et joue un rôle important dans la régulation de la plasticité synaptique (Briz & Baudry 2016).

L'activité neuronale augmente donc l'activité RNAse III de Dicer et stimule ainsi la biogenèse des microARN, localement, dans l'épine dendritique.

Un autre niveau de régulation des microARN est celui du complexe RISC (**Figure 16c**). En effet, certaines protéines du complexe RISC sont régulées par l'activité neuronale. Par exemple, Banerjee et collaborateurs ont montré que la protéine MOV10 présente aux synapses est dégradée rapidement par le protéasome de façon dépendante de l'activité médiée par les récepteurs NMDA (Banerjee et al. 2009). Ainsi le complexe RISC est perturbé et l'inhibition de la traduction des ARNm par les microARN est levée.

En 2010, Krol et collaborateurs ont mis en évidence une régulation du taux de certains microARN matures de manière dépendante de l'activité synaptique. A partir de cultures primaires de neurones corticaux et d'hippocampe, les auteurs ont montré que l'activité synaptique diminuait spécifiquement le taux des miR-124, miR-128, miR-134 et miR-138. Cet effet est aboli lorsque l'activité synaptique a été bloquée par un traitement à la tétrodotoxine. Dans les neurones hippocampiques, le blocage des récepteurs AMPA et NMDA respectivement par les inhibiteurs DNQX et CPP prévient également la diminution de ces microARN. A l'inverse, l'addition de glutamate accélère la diminution du taux des miR-124, miR-128, miR-134 et miR-138 (Krol et al. 2010).

3.4. **Rôles des microARN dans la plasticité synaptique**

De nombreux acteurs moléculaires sont impliqués dans la plasticité synaptique et les microARN apparaissent aujourd'hui comme d'importants régulateurs (Eacker et al. 2013a), (Aksoy-Aksel et al. 2014), (Ye et al. 2016).

Plusieurs éléments révèlent les liens possibles entre la plasticité synaptique et les microARN. Tout d'abord, le maintien à long terme des modifications liées à la plasticité synaptique requiert la traduction de nouvelles protéines. De plus, tous les acteurs moléculaires de la traduction sont présents localement près de la synapse : les ribosomes, les ARNm et les microARN. Enfin, l'expression des microARN est régulée par l'activité neuronale.

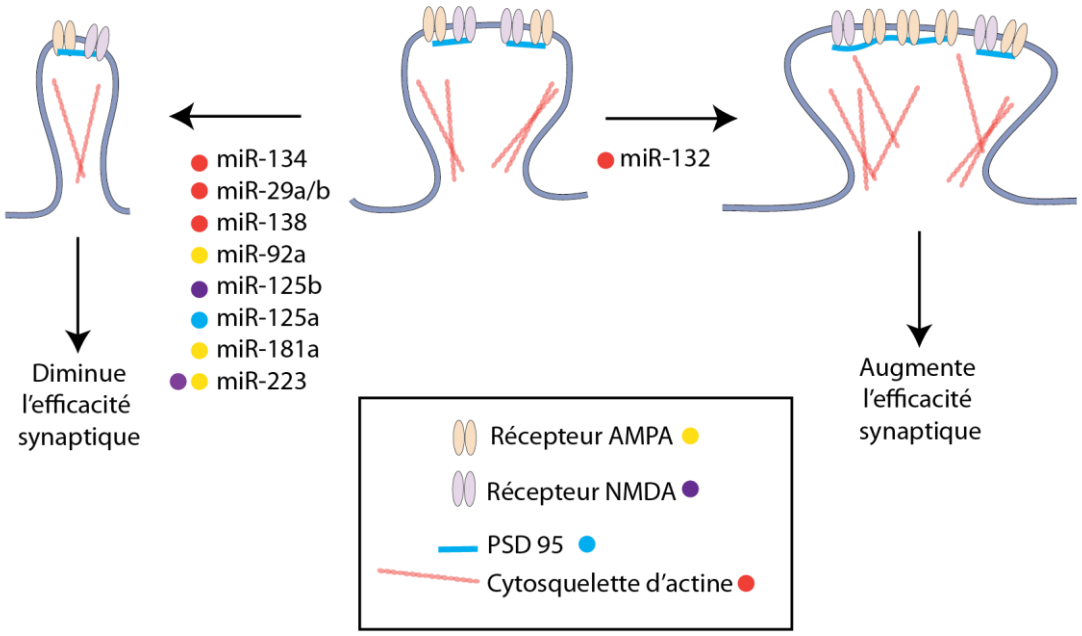


Figure 17 : microARN régulant la structure et la plasticité synaptique via l'inhibition de l'expression de protéines de l'épine dendritique. Inspiré de (Eacker et al. 2013b)**.**

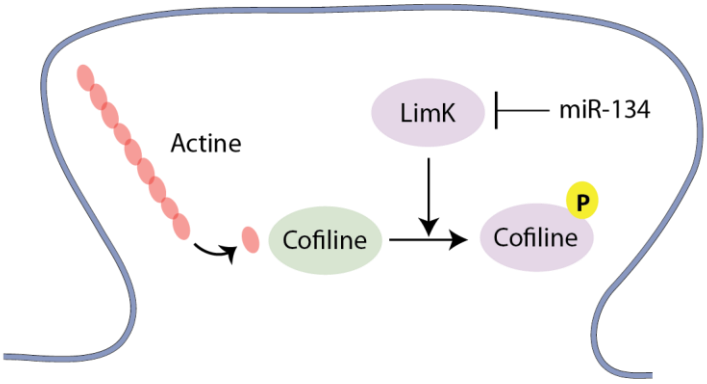


Figure 18 : le miR-134 régule le volume de l'épine via la régulation de l'ARNm de la LimK.

Plusieurs microARN ont été décrits dans des phénomènes liés à la plasticité synaptique. Par exemple, le volume de l'épine dendritique est régulé par plusieurs microARN : les miR-134 (Schratt et al. 2006), miR-29a/b (Lippi et al. 2011) et miR-138 (Siegel et al. 2009) induisent une diminution du volume de l'épine alors que le miR-132 l'augmente (Pathania et al. 2012). De plus, certains microARN ont été décrits comme régulant l'expression des récepteurs au glutamate. Par exemple, certaines sous-unités des récepteurs AMPA sont régulées par le miR-223 (Harraz et al. 2012), le miR-181a (Saba et al. 2012) et le miR-92a (Letellier et al. 2014). Il en est de même pour les récepteurs NMDA qui sont régulés par le miR-223 (Harraz et al. 2012) et le miR-125b (Edbauer et al. 2010). Les microARN permettraient une régulation fine et locale de l'expression génique en fonction de l'activité individuelle des synapses (**Figure 17**).

3.5. **Exemple du miR-134**

Le miR-134, dont l'expression est restreinte au cerveau, est un important microARN neuronal. Dans des neurones immatures (5 jours de culture) non stimulés, l'expression de ce microARN est faible. Son expression augmente drastiquement suite à une stimulation neuronale via du BDNF ou à une dépolarisation membranaire (Fiore et al. 2009). L'augmentation de son expression induite suite à une dépolarisation membranaire est due à une stimulation de la transcription du gène du miR-134 (Fiore et al. 2014).

Il a été montré que le niveau d'expression dans l'hippocampe du miR-134 augmente graduellement avec le développement et atteint son maximum à P13 (13 jours après la naissance), au moment de la maturation synaptique. Ce profil d'expression est conservé dans des cultures primaires de neurones avec un pic d'expression à 14 jours de culture, correspondant à la maturité synaptique des neurones en culture (Schratt et al. 2006). L'expression de ce microARN est liée à l'activité neuronale.

Schratt et collaborateurs ont également observé que le miR-134 se localise dans les compartiments synaptiques et est très représenté dans les dendrites, particulièrement près des synapses. Une analyse biochimique à partir de neurones matures a montré que ce microARN est enrichi dans des fractionnement cellulaires enrichies en synapses appelés « synaptosomes ».

Les auteurs se sont intéressés à l'effet du miR-134 sur la morphologie de l'épine dendritique. La transfection d'un plasmide codant pour ce microARN dans des neurones immatures (8 jours de culture) conduit à une diminution significative du volume de l'épine dendritique des neurones matures (15 jours). Il en est de même lorsque le miR-134 (synthétique) est introduit dans des neurones matures, signifiant que ce microARN perturbe les synapses déjà formées. *A contrario*, l'expression d'un anti-sens du miR-134 (dont le but est de piéger le miR-134) augmente faiblement mais significativement le volume de l'épine dendritique. Ces observations démontrent que le miR-134 régule négativement la morphologie de l'épine dendritique (Schratt et al. 2006) (**Figure 18**).

Les auteurs ont découvert que le miR-134 régule le volume de l'épine via la régulation de l'ARNm de la kinase Lim 1 (LimK1). Le rôle de cette enzyme est d'inhiber la cofiline en la phosphorylant. Le miR-134 inhibe l'expression de la LimK1 qui inhibe la cofiline dont le rôle est de dépolymériser les filaments d'actine. La morphologie des épines dendritiques est régulée par le cytosquelette d'actine. Le miR-134 lève l'inhibition de la cofiline par la LimK1, favorise donc la dépolymérisation de l'actine par la cofiline et ainsi diminue le volume de l'épine dendritique (Schratt et al. 2006).

Le même groupe a montré que la DEAH-box helicase DHX36 était responsable de la localisation dendritique du miR-134 et des modifications de la taille de l'épine dendritique (Bicker et al. 2013).

Une autre équipe s'est intéressée au lien entre le miR-134 et la plasticité synaptique. Gao et collaborateurs ont montré que l'enzyme déacétylase SIRT1 (*silent information regulator 1*) inhibe l'expression du gène du miR-134. Mais aussi que le miR-134 régule l'expression de l'ARNm du facteur de transcription CREB et en conséquence diminue l'expression de la neurotrophine BDNF dont le gène est régulé par CREB. Ils ont aussi observé que la surexpression du miR-134 bloque la potentialisation à long terme dans des neurones d'hippocampe sans affecter la transmission synaptique basale (Gao et al. 2010). Le miR-134 est donc un régulateur essentiel dans la plasticité synaptique.

4. Objectifs de la thèse

Il y a 10 ans, le laboratoire de Rémy Sadoul a été le premier à montrer que les neurones sécrètent des exosomes et ce à partir de neurones en développement (8 jours de culture) (Fauré et al. 2006). En 2011, son équipe a ensuite montré que la sécrétion des exosomes par des neurones matures (15 jours de culture) est directement régulée par l'activité synaptique glutamatergique (Lachenal et al. 2011). L'objectif de mon travail de thèse dans le laboratoire de Rémy Sadoul s'inscrivait dans la continuité de ces travaux et a porté sur l'étude du rôle des exosomes dans la communication entre les neurones.

Nous avons dans un premier temps étudié le passage des exosomes entre les neurones. Nous avons testé si des exosomes purifiés à partir de neurones ou de neuroblastomes pouvaient se fixer à et être internalisés par d'autres neurones. Ces travaux initiés par M. Chivet au cours de sa thèse (2009-2012) ont fait l'objet d'un article publié dans « Journal of Extracellular Vesicles » en 2014 dans lequel j'apparais comme co-premier auteur. La première partie des résultats sera consacrée à la présentation de cet article.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la composition en microARN des exosomes neuronaux puis nous nous sommes intéressés à l'effet des exosomes neuronaux sur les neurones. Un système rapporteur de l'activité d'un microARN a été utilisé pour tenter de mettre en évidence le transfert de microARN entre les neurones via les exosomes. Ces travaux seront présentés dans la seconde partie des résultats.

Afin de mieux comprendre la fonction physiologique de la protéine Alix, le laboratoire a développé une souris *knock out* (ko) pour cette protéine. L'objectif secondaire de mon travail a été d'étudier le rôle de la protéine Alix dans la biogenèse et le contenu des exosomes. C'est pourquoi nous avons caractérisé et comparé des exosomes purifiés à partir de cellules sauvages (wt) ou Alix ko. Ces travaux seront présentés dans la troisième partie des résultats.

Matériel et Méthodes

1. Culture primaire de neurones corticaux et purification des exosomes

Les protocoles relatifs à la culture primaire de neurones corticaux et à la purification de leurs exosomes sont détaillés dans le chapitre « *Purification and analysis of exosomes released by mature cortical neurons following synaptic activation* » que je signe en deuxième auteur et qui sera prochainement publié dans le livre « *Exosomes and Microvesicles : Methods and Protocols* » édité par A. Hill dans « Methods in Molécular Biology ».

Une étape supplémentaire a été effectuée entre les étapes 4 et 5 de la partie « *3.2 Glutamatergic synapse activation by bicuculline incubation and exosome purification* » : les surnageants ont été incubés 10 min à 37°C avec de la RNase A (0,04 mg/ml, Euromedex).

La purification sur gradient de sucrose n'a été effectuée que lorsque cela est précisé. Par défaut, la purification des exosomes fait référence au culot obtenu après ultracentrifugation des surnageants (culot 100 000 x g).

Chapter: Purification and analysis of exosomes released by mature cortical neurons following synaptic activation.

Karine Laulagnier[1,2*], Charlotte Javalet[1,2], Fiona Hemming[1,2] and Rémy Sadoul[1,2].

1) INSERM, U1236, Equipe, Neurodégénérescence et Plasticité, Grenoble, France

2) Université Grenoble Alpes, Institut des Neurosciences, Grenoble, France.

Head title: Regulated exosome secretion by cortical neurons.

Key words: exosomes, mature neurons, primary neuronal culture, regulated secretion, glutamatergic synapses, bicuculline.

Acknowledgement

K.L. was supported by "Fondation Plan Alzheimer". C.J. and M.C. were supported by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". This work was funded by INSERM, Université Joseph Fourier and ANR (08-Blanc-0271 to R.S.)

Summary

Exosomes are vesicles released by most cells into their environment upon fusion of multivesicular endosomes with the plasma membrane. Exosomes are vesicles of 60-100 nm in diameter, floating in sucrose at a density of ~1.15 g/mL and carrying a number of marker proteins such as Alix, Tsg101, Flotillin-1. We use dissociated cortical neurons cultured for around two weeks as exosome-releasing cells. In these conditions, neurons make mature synapses and form networks that can be activated by physiological stimuli. Here, we describe methods to culture differentiated cortical neurons, induce exosome release by increasing glutamatergic synapse activity and purify exosomes by differential centrifugations followed by density separation using sucrose gradients. These protocols allow purification of neuronal exosomes released within minutes of activation of glutamatergic synapses.

1. Introduction

In the following protocols, "exosomes" refer to nanovesicles released in the extracellular medium upon fusion of multivesicular endosomes with the plasma membrane. Extracellular vesicles are called exosomes when 1/ their diameter ranges from 60 to100 nm (observed by electron microscopy or nanoparticle tracking analysis), 2/ they float at a density ranging from 1.1 to 1.19 g/mL on a linear gradient of sucrose, 3/ they carry typical protein markers such as Alix, Flotillin-1, Tsg101 or CD63 (1,2). An updated profile of proteins, lipids and nucleic acids found in exosomes is available at www.exocarta.org (3). During the last ten years, vesicles having the above-described characteristics of exosomes have been detected in different biological fluids including milk, saliva (4) and cerebrospinal fluid (5). Exosomes are known to be released constitutively by various cell lines and can be purified from cell supernatants after several days of culture (6, 7). Concerning the central nervous system (CNS), several studies have shown that cultured astrocytes (8), microglia (9), and neurons (10) also secrete exosomes constitutively. These reports have led to the hypothesis that exosomes are involved in inter-cellular communications in the normal or pathological CNS (11, 12). This hypothesis has been reinforced by the demonstration that exosomes released by myelinating cells (oligodendrocytes in the CNS and Schwann cells in the peripheral nervous system) can be endocytosed by neurons (13, 14). A few studies have described exosome release within minutes in a regulated way following a rise of intracellular calcium due to calcium ionophores (15, 16) or activation of specific membrane receptors (17). We have used neurons dissociated from rat cortices and cultured for 2 weeks in order to investigate how the release of exosomes might be regulated by neuronal activity. These cell cultures contain both excitatory glutamatergic and inhibitory GABAergic neurons, which make functional networks by the second week in culture. Thus, incubation with GABA receptor antagonists, such as picrotoxin or bicuculline, alleviates inhibitory activities within the networks and increases the excitatory activity of glutamatergic synapses (18, 19). We have already reported that picrotoxin or bicuculline rapidly (10–15 min) and massively augmented the calcium-dependent secretion of exosomes in a way dependent on AMPA- and NMDA-receptors (20). The first part of this chapter describes our protocol for the preparation of viable primary cultures of neurons up to their mature state. The second part explains how to stimulate exosome release using bicuculline. Finally, we give details for purifying

exosomes from supernatants of stimulated neurons: this is based on low speed centrifugations required to remove cell debris, followed by ultracentrifugation to pellet the nanovesicles. The vesicles are then purified on a linear 8-60% sucrose gradient where they move to a density of 1.1-1.15 g/mL. This protocol allows the characterization of a homogeneous exosome population, whose release is tightly regulated by glutamatergic activity (Figure 1).

2. Materials

2.1. Primary cultures of cortical neurons

1. Animal: use one pregnant rat (OFA strain) at embryonic day 18 (usually ~12-13 embryos) for 1 culture.

2. Borate buffer 0.1 M, pH 8.4: dissolve 3.1 g boric acid (H_3BO_3) and 4.75 g sodium tetraborate (borax) in 1L of distilled water. Adjust to pH 8.4. Filter the solution (0.22 µm) and store at 4°C.

3. Coating solution: dissolve poly-D-lysine (PDL, Sigma, molecular weight 30,000-70,000) in borate buffer in order to obtain a 50 µg/mL solution.

4. Dissection buffer: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, no calcium, no magnesium, no phenol red, Life technologies) with 1 mM HEPES (Life technologies) and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Life technologies,). Adjust pH to 7.4, filter (0.22 µm) and store at 4°C.

5. Hemocytometer (Malassez ™ or equivalent).

6. Seeding medium: the day of seeding, prepare ~200 mL of DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; high glucose; pyruvate; Life technologies) with 10% horse serum (v/v; heat-inactivated; Life technologies).

7. Trypsin solution: 0.25%-trypsin EDTA (Life technologies) containing 15 mM HEPES and 33 mM D-glucose. Ready to use aliquots of 3 mL can be stored for weeks at -20°C.

8. Trypsin inhibitor solution: dissolve soybean trypsin inhibitor powder (Sigma) in the dissection buffer to a final concentration of 2 mg/mL. Ready to use aliquots of 3 mL can be stored for weeks at -20°C.

9. Neuron culture medium: supplement ~250 mL of Neurobasal® medium (Life technologies) with 2% B27® (v/v; serum free supplement; Life technologies), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate.

10. Cytosine-β-d-arabinofuranoside hydrochloride (AraC ; Sigma) solution: dissolve AraC in sterile distilled water to obtain a stock solution at 10 mM. Aliquot and store at -20°C.

2.2. Release of exosomes by mature cortical neurons

1. K5 solution: 5 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, 110 mM NaCl, 26 mM $NaHCO_3$, 1 mM NaH_2PO_4, 0.7% (w/v) D-glucose and 15 mM HEPES. Adjust pH to 7.4. Filter (0.22 µm) and keep at 4°C (*see* Note 1).

2. Bicuculline stock solution: dissolve bicuculline methiodide powder (Sigma) in pure distilled water at 5 mM, aliquot and store at -80°C.

3. Stimulating solution: the day of experiment, prepare K5 solution with 40 µM of bicuculline. Prepare 80 mL for the stimulation of twenty 100 mm dishes of neurons (52 x 10^6 neurons).

2.3. Exosome purification

1. 50 mL tubes that can withstand 20,000 x *g* centrifugation (e.g. Falcon® tubes).

2. Centrifuge allowing 20,000 x *g* run (Sorvall Sc60 or equivalent).

3. Fixed-angle rotor allowing 20,000 x *g* centrifugation (F13-14X50CY FIBERLite® Thermo Scientific or equivalent).

4. Swinging rotor (SW41 and SW32 from Beckman Coulter or equivalent).

5. Ultracentrifuge (Optima L-90K or equivalent).

6. Ultracentrifugation tubes in polyallomer or Ultraclear™ for SW41 (maximum 12 mL) and SW32 (maximum 35 mL) swinging rotors.

7. Gradient maker connected to a peristaltic pump and a glass capillary tube.

8. Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS, no calcium, no magnesium, Life technologies).

9. 8% and 60% sucrose solutions (w/v) in distilled water containing 3 mM imidazole. 6 mL of each solution are required for 1 gradient. Adjust to pH 7.4. Filter solutions through a 0.22 µm sterile filter. Store at 4°C.

10. Refractometer 0-72% (Euromex or equivalent)

11. Washing solution: 3 mM imidazole in distilled water. Adjust to pH 7.4. Store at 4°C. ~100 mL are required for 1 gradient.

12. Hydrophilic syringe filter unit, 0.22 µm, PVDF (Millex-GV Durapore® Millipore or equivalent).

3. Methods

Pre-warm all media and solutions to 37°C except when specified. Pre-cool all centrifuges to 4°C except when another temperature is indicated.

Four 100 mm dishes (1 x 10^6 neurons) are required to complete purification of exosomes at step 12 of heading 3-2 ("exosome pellet"). Twenty 100 mm dishes (5 x 10^7 neurons) are needed when exosomes need to be purified on a linear gradient of sucrose (steps 1 to 22 of heading 3-2).

3.1. Primary culture of cortical neurons from 18-day old rat embryos

1. Coating of dishes: add 4 mL of the PDL solution per 100 mm dish i.e. 2.6 µg PDL/cm^2 (*see* Note 2). Leave dishes for at least 4 h before seeding in a humidified incubator at 37°C. Rinse dishes 3 times with sterile water. Finally, add 8 mL seeding medium per dish and incubate at 37°C in a humidified incubator.

3. Dissection of rat embryo brains (*see* Note 3): isolate embryos and cover them with dissection solution. Dissect out cortices from rodent brains *(see* Note 4*)* and pool them in 15 mL tubes filled with dissection solution.

4. Dissociation of cortical neurons by trypsin: let cortices sediment in the 15 mL tube. Remove supernatant and add 3 mL of pre-warmed trypsin solution. Place the tube horizontally in the incubator at 37°C, 5% CO_2 for 15 min. Turn it back to vertical and let cortices sediment. Remove trypsin solution. Add 5 mL of dissection solution to wash the cortices. Let the cortices sediment. Remove the supernatant. Repeat the wash once more. Add 3 mL of trypsin inhibitor solution. Place the tube horizontally in the incubator at 37°C for 2 min. Turn it back to vertical and let cortices sediment. Remove

the trypsin inhibitor solution. Rinse twice with dissection solution. Finally, add 5 mL of dissection solution to the cleaned cortices.

5. Mechanical dissociation of cortical neurons: aspirate and flush the cortices first with a 5 mL pipette, then with a 1 mL tip (~40 ups and downs) to obtain a homogeneous solution. Be careful to avoid bubbles.

6. Filter the homogenate through a 70 µm filter (BD falcon) placed above a 50 mL tube to remove debris. Centrifuge the cells for 5 min at room temperature at 100 x *g*. Delicately remove the supernatant, add 5 mL of seeding medium to the pellet and slowly homogenate the cell suspension. Keep the cell suspension at 37°C in a water bath.

7. Counting neurons: mix 10 µL of the cell suspension with 170 µL HBSS solution and 20 µL Trypan blue. Load this cell dilution into a hemocytometer. Count only living cells (dead cells will be dyed blue) under the microscope (*see* Note 5).

8. Seeding cortical neurons: plate neurons at a density of 3×10^4 cells/cm^2, i.e. 26×10^5 neurons per 100 mm coated-dish. An example of counting and seeding is given in Note 6.

9. Primary cultures (*see* Note 7): After 2 h, replace 75% seeding medium by neuron culture medium. Repeat this again immediately. This can be done up to 24 h after plating neurons (*see* Note 8*).*

10. After 4 days in vitro (DIV), add 20% complete culture medium supplemented with 5 µM AraC (final concentration) per dish. AraC is used to stop glial cells proliferation (*see* Note 9).

11. At 11 DIV, add 10% pre-warmed culture medium to each dish.

12. Cortical neurons can be used at DIV14-15.

3.2. Glutamatergic synapse activation by bicuculline incubation and exosome purification

1. Wash the dishes (*see* Note 10) by removing 80% of the culture medium and gently adding 4 mL of K5 medium per dish. Repeat once.

2. Add 4 mL per dish of bicuculline-containing solution (*see* Note 11).

3. Leave dishes 15 min at 37°C in the incubator.

4. Harvest and pool supernatants of bicuculline-treated cells and keep all tubes on ice during exosome purification.

5. Centrifuge supernatants for 10 min at 2,000 x *g* at 4°C (*see* Note 12).

6. Transfer each supernatant to 50 mL tubes.

7. Centrifuge for 30 min at 20,000 x *g* at 4°C (*see* Note 13).

8. Filter supernatants through a 0.22 µm filter and transfer them to ultracentrifuge tubes (*see* Note 14). Tubes for a SW41 rotor have to be filled up to 10 mL. Tubes for a SW32 rotor have to be filled up to 30 mL.

9. Weigh and equilibrate the tubes with PBS.

10. Run 90 min at 100,000 x *g* at 4°C (*see* Note 15).

11. Gently remove the supernatant and invert the tubes on an absorbent paper. The pellet corresponds to the "exosome pellet" (*see* Note 16).

12. You can stop the purification at this step and resuspend the exosome pellet in SDS-sample buffer for Western blot analysis (Figure 1A-B).

13. For further purification of exosomes on a sucrose gradient, gently resuspend the exosome pellet in 300 µL 8% sucrose solution (*see* Notes 17 and 18).

14. Make a continuous gradient from 8% to 60% sucrose in a SW41 tube (*see* Note 18).

15. Gently add the 300 µL exosome sample from step 13 to the top of the gradient

(*see* Note 19).

17. Centrifuge the gradient 18 h at 210,000 x *g*, at 4°C.

18. Collect 1 mL fractions starting from the top of the gradient and transfer each fraction to a new SW41 ultracentrifuge tube. Gently shake each fraction to homogenize the sucrose concentration.

19. Place 10 µL of each fraction in the refractometer to measure their sucrose density (*see* Note 20).

20. Add 10 mL of washing solution to each SW41 tube containing the fractions and mix.

21. Ultracentrifuge all fractions for 2 h at 210,000 x *g* at 4°C (*see* Note 21). Tubes can be kept on ice before centrifugation.

22. Discard the supernatant and resuspend each pellet in the required buffer (e.g. SDS-sample buffer for Western blot analysis). Analyses of the exosome pellet from step 12 and of fractions of a typical gradient are shown in figure 1.

4. Notes

1. An improvement of these protocols is to replace K5 solution by Neurobasal® medium (Life technologies) to harvest exosomes. This avoids any shock caused by a change in medium composition.

2. The PDL concentration used for coating is critical for the viability of the culture. Take care to homogenize the solution before use and do not leave the coated-dishes more than 48 h in the incubator.

3. All the instruments (forceps, scissors…) must be sterile. In order to avoid neuronal mortality, the time between the moment you harvest embryos and the seeding of cells should not exceed 2 h. Generally, 9 embryos are enough for twenty 100 mm dishes of neurons (5×10^7).

4. Dissection of pup brains (similar to E18 embryos brain) is described in (21). Briefly, under a sterile hood, decapitate each embryo and transfer the heads to a dish filled with pre-warmed dissection solution. Insert the tips of fine scissors into the aperture made by the section of the vertebral column and cut forwards, along the skull dorso-laterally, taking care not to damage the brain. Remove the top of the skull to uncover the brain. Slide the closed tips of forceps underneath the brain to push it out from the skull. Transfer it to a new dish filled with clean dissection solution and then work under a binocular microscope for the next steps which need fine forceps. Separate the two hemispheres, remove meninges, then cleave off the olfactory bulbs, brain stem, and the cerebellum. Finally, dissect out the hippocampus to obtain clean cortices.

5. Counting is a critical step because the seeding density determines the viability of the primary culture.

6. From ~12 embryos, we generally obtain ~14 x 10^7 living neurons in the 5 mL cell suspension. After diluting 10 times in seeding medium, we distribute ~950 µL of the cell suspension per 100 mm dish to obtain a seeding density of 26 x 10^5 neurons per 100 mm dish (3 x 10^4 cells/cm^2).

7. Primary cultures are highly sensitive to changes in pH and temperature. Therefore, avoid opening and closing the incubator as much as possible over the whole culture period. Keep an incubator dedicated to long term neuronal culture, if possible. Do not leave neurons outside the incubators for long.

8. Never replace 100% of the culture medium to avoid drying the cells. Aspirate only 6 mL of seeding medium and replace it gently without flushing by 6 mL of culture medium.

9. Primary cultures can be grown without AraC. In this case, the cultures contain a mix of neurons and glial cells. They are less fragile and can be kept alive longer than when grown with AraC. However, as described in the introduction, exosomes are secreted by glial cells present in the culture (astrocytes, oligodendrocytes, and microglia). We use an antibody against L1-Cam to differentiate exosomes released by neurons from exosomes released by glial cells since L1-Cam is exclusively expressed by neurons (cf Figure 1B).

10. Always check the viability of each dish under a microscope before use. Do not use cultures if the neurons are not refringent.

11. As a control, two dishes are treated in the same conditions with K5 without bicuculline. In our hands, only few exosomes are released without bicuculline treatment. See figure 1A-B to compare the 2 conditions.

12. This step removes dead cells and nuclei.

13. This step removes large debris and microvesicles.

14. This step further cleans the supernatants, in particular removes vesicles bigger than 200 nm.

15. Different times and speeds of ultracentrifugation can be found in the literature to pellet nanovesicles. Run for at least 60 min at 100,000 x *g*, (calculation based on the speed at the bottom of the tube). However, many ultracentrifuges include the

acceleration and/or deceleration phases in their timing. It is thus recommended to increase the length of the run. Running too slow can lead to a loss of material. Running too fast (more than 200,000 x *g*) and too long (more than 2h) can lead to contamination of the pellet by lighter particles such as endoplasmic reticulum or mitochondria-derived vesicles.

16. Exosome pellets purified from neuronal supernatants are not visible. White opaque material is not relevant to vesicle pellets but to contaminating debris. Nanovesicle pellets are known to adhere quite strongly to plastic tubes so prolonged but gently flushing (at least 100 ups and downs) is needed to resuspend pellets correctly. Flush only the bottom but not the walls of the tube and avoid bubbles.

17. Harvest 30 µL from the 300 µL and mix directly with a concentrated SDS-sample buffer ("10% input"; Figure 1C).

18. Various protocols for making sucrose gradient can be found in the literature (22). Before pouring the gradient, mark the ultracentrifuge tube at the 10 mL level. In the gradient former, add 5.5 mL of 60% sucrose solution in the chamber 1 and 5.5 mL 60% sucrose solution in the chamber 2 which is linked by tubing to the pump. Avoid bubbles in the tubules between the two chambers. Place the magnetic bar in chamber 2, switch on the stirring and check the efficiency and regularity of the stirring speed. Place the capillary at the bottom of the ultracentrifuge tube. Switch on the pump at a speed of ~1 mL/min and immediately open the clamp between the two chambers. Stop the pump when the gradient volume reaches the 10 mL mark. Delicately remove the capillary from the tube.

19. To balance the rotor, fill a second ultracentrifuge tube with 5.3 mL of 8% sucrose solution and 5 mL of 60% sucrose solution. Equilibrate the tubes with the 8% sucrose solution.

20. Check the linearity of the gradient by tracing the sucrose density as a function of the fraction.

21. The purpose of this ultracentrifugation step is to concentrate vesicles and wash out sucrose from each fraction. The speed and length of centrifugation is thus faster and longer than the first ultracentrifugation in step 7 without risk of contamination.

References

1. Thery, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009) *Nat Rev Immunol* 9, 581-93.

2. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., and Altevogt, P. (2006) *Immunol Lett* 107, 102-8.

3. Mathivanan, S., and Simpson, R. J. (2009) *Proteomics* 9, 4997-5000.

4. Lasser, C., Alikhani, V. S., Ekstrom, K., *et al.* (2011) *J Transl Med* 9, 9.

5. Vella, L. J., Greenwood, D. L., Cappai, R., *et al.* (2008) *Vet Immunol Immunopathol* 124, 385-93.

6. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., *et al.* (1996) *J Exp Med* 183, 1161-72.

7. Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002) *Nat Rev Immunol* 2, 569-79.

8. Wang, G., Dinkins, M., He, Q., *et al*. (2012) *J Biol Chem* 287, 21384-95.

9. Potolicchio, I., Carven, G. J., Xu, X., *et al*. (2005) *J Immunol* 175, 2237-43.

10. Faure, J., Lachenal, G., Court, M., *et al*. (2006) *Mol Cell Neurosci* 31, 642-8.

11. Fevrier, B., Vilette, D., Laude, H., and Raposo, G. (2005) *Traffic* 6, 10-7.

12. Smalheiser, N. R. (2007) *Biol Direct* 2, 35.

13. Kramer-Albers, E. M., Bretz, N., Tenzer, S., *et al*. (2007) *Proteomics Clin Appl* 1, 1446-61.

14. Lopez-Verrilli, M. A., Picou, F., and Court, F. A. (2013) *Glia* 61, 1795-806.

15. Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., *et al*. (2004) *Biochem J* 380, 161-71.

16. Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M. I. (2002) *J Cell Sci* 115, 2505-15.

17. Vincent-Schneider, H., Stumptner-Cuvelette, P., Lankar, D., *et al*. (2002) *Int Immunol* 14, 713-22.

18. Bading, H., and Greenberg, M. E. (1991) *Science* 253, 912-4.

19. Ichikawa, M., Muramoto, K., Kobayashi, K., *et al.* (1993) *Neurosci Res* 16, 95-103.

20. Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., *et al.* (2011) *Mol Cell Neurosci* 46, 409-18.

21. Beaudoin, G. M., 3rd, Lee, S. H., Singh, D., *et al*. (2012) *Nat Protoc* 7, 1741-54.

22. Marks, M. S. (2001) *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 5, Unit 5 3.

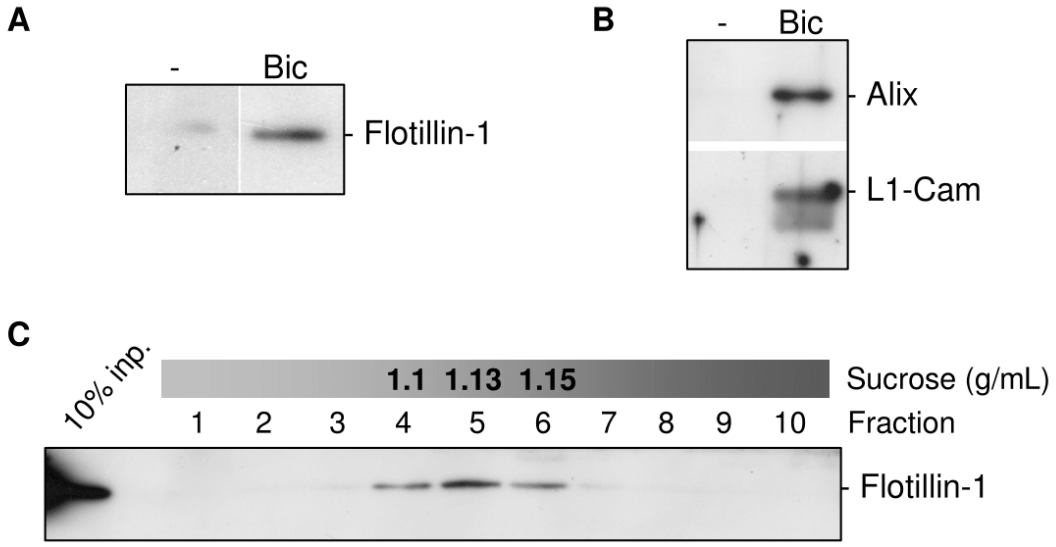


Figure 1: release of exosomes by mature neurons under glutamatergic stimulation. 5 x 106 cortical neurons were grown with (A) or without (B) AraC to DIV15. As described in 3-2, neurons were incubated in Neurobasal® medium alone (« - ») or with 40 µM bicuculline (« Bic ») for 15 min at 37°C. Exosomes were pelleted from supernatants by ultracentrifugation. Pellets were resuspended in sample buffer, run on SDS-PAGE and blotted against exosomal markers Flotillin-1 (50 kDa) and Alix (92 kDa) or the neuronal marker L1-Cam (200 kDa). Synaptic activation by bicuculline increases the amount of exosomes released by neurons as revealed by the increase in the detection of exosomal markers. (C) 5 x 107 neurons were treated with bicuculline-containing medium. Exosomes were pelleted from supernatants by ultracentrifugation and resuspended in 8% sucrose solution. 10% of the sample was run and blotted directly (« 10% inp. »). The remaining 90% were loaded onto a 8-60% sucrose linear gradient and ultracentrifuged. Ten fractions of the gradient were collected, washed by ultracentrifugation and pellets were resuspended in sample buffer for Western blot analysis. The exosomal marker Flotillin-1 appears in 3 fractions ranging from 1.1 to 1.15 g/mL of sucrose as expected for exosomes.

2. Culture primaire de neurones d'hippocampe

Les neurones corticaux et hippocampiques sont prélevés à partir d'un même embryon. Ces deux cultures primaires sont effectuées selon le même protocole décrit précédemment (voir paragraphe 1). Pour les neurones d'hippocampe les étapes de filtration sur un tamis cellulaire et de centrifugation ont été supprimées par rapport protocole utilisé pour la culture de neurones corticaux.

Les neurones d'hippocampe ont été ensemencés à une densité de 2.10^4 cellules/cm^2 dans des boîtes 35 mm contenant des lamelles d'un diamètre de 14 mm ou dans des plaques 4 puits. Toutes les boîtes de cultures et lamelles de verre ont été traitées avec une solution à 50 µg/ml de poly-D-Lysine. Après transfection des neurones, les lamelles ont été transférées dans des puits de plaque 4 puits. Les neurones d'hippocampe n'ont pas subi de traitement à l'AraC (cytosine-β-d-arabinofuranoside).

3. Séquençage microARN

Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules ou des exosomes en utilisant le kit miRNeasy (Qiagen). Les ARN ont été analysés au Bioanalyzer (Agilent Technologie) et le RIN (*RNA integrity number*) a été calculé (tous les échantillons issus de neurones ont obtenu un RIN ≥ 7). La librairie d'ARN a été préparée en utilisant le kit NEBNext (NEB) à partir de 1 µg d'ARN cellulaire pour les échantillons de neurones et 100 ng d'ARN pour les exosomes. Le séquençage a été effectué par le séquenceur Illumina HiSeq (50 paires de bases). La qualité de chacune des lectures a été évaluée par fastQC et analysée par le logiciel Cutadapt. Les séquences Fasta de 16 nt ou plus ont été extraites pour générer des séries de séquences non redondantes à l'intérieur de chaque échantillon. MiRdeep2 a été utilisé pour identifier les microARN lus au moins 90 fois dans les 9 librairies analysées. Les abondances relatives des microARN ont été calculées en divisant le nombre total de lectures des microARN de chaque librairie. Les données ont ensuite été triées pour ne conserver que celles dont l'abondance en microARN est de 0,01% ou plus dans les 9 échantillons. Les données ont ensuite été converties en logarithme à base 2 ou 10 et un *heatmap* a été construit en utilisant le *package* heatmap.2 (Bioconductor) dans le logiciel R.

4. Incubation des exosomes neuronaux

Les exosomes purifiés à partir de 7.10^6 neurones corticaux (soit 20.10^9 particules estimées) ont été resuspendus dans 50 µl de milieu de culture conditionné de neurones d'hippocampe et incubés dans un puit ensemencé avec 4.10^4 neurones d'hippocampe. Les neurones contrôles n'ont pas été incubés avec des exosomes mais seulement avec 50 µL de milieu conditionné. Pour une expérience, chaque condition a été réalisée sur 2 à 4 puits.

5. Clonages

Les systèmes rapporteurs de l'activité du miR-134 tels que décrits précédemment (Schratt et al. 2006) nous ont été fournis par le laboratoire de G. Schratt. A partir de leurs constructions réalisées dans le vecteurs pGL3 la séquence codante de la luciférase firefly suivie de la partie 3'UTR de la Limk1 de rat wt ou mutée (m191) a été amplifiée par PCR (amorces ci-dessous) et clonée (In Fusion-Clontech) dans le vecteur lentiviral pWPXLd ouvert par un site de restriction unique XhoI. La séquence codante de la luciférase Renilla a été amplifiée par PCR (amorces ci-dessous) et également clonée (In Fusion-Clontech) dans le vecteur lentiviral pWPXLd dans le site XhoI. Dans les deux cas, le promoteur EF1α du vecteur pWPXLd a préalablement été remplacé par le promoteur de la synapsine 1 amplifié par PCR (amorces ci-dessous) à partir de l'ADN génomique de rat et cloné en SalI et SwaI.

Amorces PCR luciférase firefly-LimK1 3'UTR :
Sens : 5'-CGAGACTAGCCTCGAGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG-3'
Antisens : 5'-TAGTTTAAACCTCGAGGGCCTTGCCTCTTTCAGTC-3'

Amorces PCR Renilla :
Sens : 5'-CGAGACTAGCCTCGAGATGACTTCGAAAGTTTATGATCC-3'
Antisens : 5'-TAGTTTAAACCTCGAGTTGTTCATTTTTGAGAACTCGCT-3

Amorces PCR synapsine 1 :
Sens : 5'-CGGTATCGATGTCGACGAAGAGGCTGAATACACATCAGAGT-3'
Antisens : 5'-AGATTAATTAAATTTAAATAAGGGGCAGTGGGTCGG-3'

6. Production des lentivirus

Les lentivirus ont été produits par des cellules HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293T cultivées dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé, 2 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine. Pour la production des lentivirus, 16 boîtes de 10 cm ont été ensemencées à $2{,}6.10^6$ cellules/boîte et transfectées 24 h plus tard avec trois plasmides (constituant un système lentiviral de 2nde génération) selon la méthode de précipitation au phosphate de calcium. 900 µl de $CaCl_2$ à 2 M ont été ajoutés à 7200 µl d'eau distillée contenant 138 µg du plasmide PAX2 (plasmide codant pour les protéines permettant l'empaquetage du virus), 138 µg du plasmide pWPXLd (plasmide d'intérêt, codant pour les luciférases) et 32 µg de pCMV-VSVG (plasmide codant pour les protéines d'enveloppe du virus). Ce mélange a été ajouté goutte à goutte avec une agitation continue à vitesse moyenne à 7200 µl de 2×HBS (Sigma-Aldrich). Après 10 min d'incubation à température ambiante, 900 µl de solution de transfection ont été déposés par boîte. Le milieu de culture a été changé 8 h après la transfection. Après 48 h, les surnageants cellulaires contenant les virus sécrétés ont été collectés, centrifugés 5 min à 600 g pour éliminer les débris cellulaires et filtrés avec une membrane de porosité 0,45 µm. Les lentivirus ont été culotés par centrifugation du surnageant à 3000 g pendant 24 h, puis resuspendus dans 400 µl de DMEM, aliquotés, congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C.

7. Test luciférase

Après 10 jours de culture, les neurones d'hippocampe ont été transduits avec deux lentivirus : l'un codant pour la luciférase Renilla et l'autre codant pour la luciférase firefly wt ou m191. Les deux luciférases sont sous le contrôle du promoteur de la synapsine. Après 48 h d'incubation des exosomes (voir paragraphe4), les neurones d'hippocampe ont été lysés et l'activité luciférase a été mesurée avec le kit dual luciferase assay (Promega). Le rapport de l'activité luciférase firefly sur l'activité luciférase Renilla est calculé pour chacun des puits. La moyenne des rapports de l'activité luciférase (firefly/Renilla) de 2 à 4 puits différents a été calculée et rapportée à la moyenne de la condition contrôle sans exosome.

8. Transfection des neurones

Après 10 jours de culture, les neurones d'hippocampe ont été transfectés avec un plasmide codant pour la protéine fluorescente mCherry selon la méthode de précipitation au phosphate de calcium optimisée pour des cultures primaires de neurones matures (Goetze 2004, Jian and Chen 2006). 5 µl de $CaCl_2$ à 250 mM ont été ajoutés à 45 µl d'eau distillée contenant 3 µg d'ADN, mélangés et ajoutés goutte à goutte à 50 µl de 2×N, N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES)-buffered saline solution, pH 7.1. Le mélange a été homogénéisé délicatement (en tapotant le tube puis en bullant de l'air), incubé 10 min, puis déposé sur les neurones incubés dans 1 ml de milieu de transfection (Eagle's MEM contenant 2,2% $NaHCO_3$ supplémenté avec 2% B27, 0,5 mM glutamine et 20 mM glucose). Après 1 h d'incubation, les lamelles sont transférées dans une boîte de 35 mm contenant 2 ml de milieu de transfection sans B27 préalablement incubée pendant 30 min dans un incubateur à 10% CO_2. Les lamelles sont rapidement incubées à 5% CO_2 pendant 10 min puis réincubées dans leur milieu de culture d'origine (conditionné).

9. Analyse du volume de l'épine dendritique

Après 48 h d'incubation des exosomes (voir paragraphe4), les lamelles sont fixées 10 min avec une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde et 4% de sucrose. Après marquage des noyaux avec du Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), les lamelles ont été montées sur une lame avec du Mowiol (Calbiochem). Les observations ont été réalisées avec l'objectif 63X à immersion à huile au microscope confocal à fluorescence (LSM 710, Zeiss), piloté par le logiciel ZEN. Pour chaque neurone, 20-25 sections optiques ont été acquises (taille du voxel : 0,1 × 0,1 × 0,2 μm^3). La reconstruction et l'analyse du volume des épines dendritiques visualisées par la fluorescence due à la mCherry ont été obtenues par le logiciel NeuronStudio (Rodriguez et al. 2008).

10. Fibroblastes embryonnaires de souris (MEF)

Les procédures impliquant les animaux et leurs soins ont été suivies en conformité avec le décret français n°118 du 1er février 2013. Tous les efforts possibles ont été faits pour minimiser le nombre d'animaux utilisés. Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF pour *mouse embryonic fibroblasts*) ont été obtenus à partir d'embryons de 12,5 jours issus de croisements de souris hétérozygotes $Alix^{+/-}$ tel que décrit dans l'article de V. Mercier (Mercier et al. 2016). Les MEF issus de 3 embryons (Alix wt ou ko) ont été rassemblés et congelés dans de l'azote liquide. Les MEF Alix ko ont été immortalisés (ko iMEF) et l'expression d'Alix a été restaurée par infection d'un virus exprimant la protéine Alix sous le contrôle du promoteur EF1α (Alix iMEF). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé (FBS) et 2 mM de L-glutamine.

11. Purification des exosomes de MEF et iMEF

Pour purifier les exosomes de MEF, les cellules ont été lavées deux fois en PBS puis cultivées 48 h dans un milieu de culture (DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamine) préalablement ultracentrifugé (18 h, SW40Ti, vitesse au milieu : 35 000 rpm) pour éliminer les vésicules extracellulaires présentes dans le sérum.

Pour l'analyse lipidomique des exosomes, le sérum a été remplacé pour éliminer les traces des vésicules extracellulaires présentes dans le sérum ultracentrifugé. Les cellules iMEFs ont été trypsinées, lavées deux fois en PBS par des centrifugations successives (5 min, 150 g) puis cultivées sur de la fibronectine (10 µg/ml, F1141, Sigma-Aldrich) dans du DMEM contenant 10% de *KnockOut™ Serum Replacemen*t (Thermo Fischer Scientific), 2 mM de L-glutamine, 6,7 ng/ml de sélénite de sodium, 5 µg/ml d'insuline et 5,5 µg/ml de transferrine. Après 20 h de culture, le milieu a été récolté et les exosomes ont été purifiés par centrifugations différentielles et ultracentrifugation telles que décrites dans le protocole pour les exosomes neuronaux.

12. Cryo-microscopie électronique

Pour l'observation en cryo-microscopie électronique, les exosomes purifiés à partir de 2.10^6 MEF (soit 50.10^9 particules estimées) ont été resuspendus dans 100 µl de 150 mM NaCl et 20 mM d'Hepes puis chargés sur une grille (Quantifiol R2/1 holey grid, Quantifiol Micro Tools GmbH, Allemagne) et vitrifiés (Mark IV vibrobot, FEI). Les grilles congelées ont été transférées sur un microscope électronique à transmission Polara (canon à émission de champ de 300 kV). Les images ont été faites sous des conditions à faible dose (moins de 20e-/Å2) avec un grossissement de 39 000 x utilisant une caméra Ultrascan 4Kx4K GATAN CDD. Deux grilles ont été préparées et imagées pour chaque échantillon. Le diamètre des vésicules a été mesuré à l'aide du logiciel ImageJ.

13. Nanosight

Le nombre d'exosomes et leur taille dans une solution ont été déterminés par une méthode d'analyse du suivi de ces nanoparticules dans un flux. Pour cette analyse les exosomes purifiés de iMEFs ont été resuspendus dans du PBS stérile et cette solution a été injectée de façon continue avec un pousse seringue dans un NanoSight NS300 488HS (Malvern Instrument Limites, Royaume-Uni). Cet appareil permet de suivre et d'enregistrer le mouvement brownien de chaque particule grâce à une caméra numérique (niveau de la caméra à 16 et seuil à 5). Les enregistrements vidéo, analysés avec le logiciel NTA 3.0, ont permis de déterminer le nombre de particules présentes dans la solution. La taille de ces vésicules a également pu être calculée à partir de ces enregistrements vidéo par l'application de l'équation de Strokes-Enstein. Pour chaque échantillon (en triplicatas) 5000 suivis de particules ont été analysés et cela répété trois fois.

14. Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

Protéine	Spécificité	Espèce	Référence	Fournisseur	Utilisation
Alix	Polyclonal	Lapin	Pab0204	Covalab	Wb
CD63	Monoclonal	Souris	556019	BD Pharmingen	ME
CD63	Monoclonal	Rat	D263-3	Medical Biological Laboratories	Wb
EEA1	Monoclonal	Souris	sc6415	Santa Cruz Biotechnology	IF
Flotilline-1	Monoclonal	Souris	610820	BD Transduction Laboratories	Wb
GFAP	Monoclonal	Souris	#3670	Cell Signaling	IF
GFP	Monoclonal	Souris	MMS-118R	Covance	Wb et ME
GFP	Polyclonal	Lapin	A11122	Life Technologies	ME
hnRNPA2B1	Monoclonal	Souris	sc-53531	Santa Cruz Biotechnology	Wb
Lamp-1	Polyclonal	Lapin	ab24170	Abcam	IF
LBPA	Monoclonal	Souris	J. Gruenberg (Université de Genève)		IF
MAP2	Monoclonal	Souris	5622	Millipore	IF
O4	Monoclonal	Souris	J.C. Deloulme (Grenoble Institut des Neurosciences)		IF
PSD95	Monoclonal	Souris	ab2723	Abcam	IF
Synaptophysine	Monoclonal	Souris	S5768	Sigma Aldrich	IF

Les anticorps secondaires utilisés en Western blot (Wb) sont : anticorps de chèvre anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin couplés à la HRP (Jackson ImmunoResarch) et anti-IgG de rat couplé à la HRP (Jackson ImmunoResarch) ; en immunofluorescence (IF) sont : anticorps de chèvre anti-souris ou anti-lapin couplés à l'Alexa 488, 594 ou la Cyanine 5 (Jackson ImmunoResearch).

15. Western blot

Pour les analyses en Western blot des exosomes de MEF, le culot d'exosomes (soit 20.10^9 particules estimées) a directement été resuspendu dans 40 µl de tampon Laemmli. La détection de la protéine CD63 se faisant dans des conditions non réductrices, le tampon Laemmli utilisé ne contenait pas de β-mercaptoéthanol. La totalité des protéines exosomales ainsi que les protéines contenues dans un volume constant de lysat cellulaire (5 µL soit 0,5% du lysat cellulaire de 4.10^5 cellules MEF) ont été chargées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10%.

Pour les analyses en Western blot des exosomes de neurones, le culot d'exosomes (soit 13.10^9 particules estimées) purifiés à partir de 5.10^6 neurones corticaux a directement été resuspendu dans 40 µl de tampon Laemmli. La totalité des protéines exosomales ainsi que 10 µg de protéines contenues dans le lysat cellulaire des neurones ont été chargées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10%.

Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF, Millipore). La membrane a été saturée pendant 1 h dans du TBS 0,1% Tween, 5% lait. L'incubation des anticorps a également été effectuée dans du TBS 0,1% Tween, 5% lait, une nuit à 4°C pour les anticorps primaires et 1 h à température ambiante pour les anticorps secondaires. La révélation a été obtenue par chemiluminescence sur des films Hyperfilm-ECL (Amersham). L'intensité des bandes a été analysée à l'aide du logiciel ImageJ.

16. Analyse lipidomique

Pour l'analyse de la composition en lipides des exosomes, les exosomes purifiés (culot 100 000 g) à partir de 2.10^6 iMEFs (soit 40 µg de protéines) ont été resuspendus dans 100 µl de PBS. Les cellules iMEF ont été trypsinées et lavées deux fois en PBS par des centrifugations successives (5 min, 150 g) puis resuspendues dans 100 µl de PBS. Les lipides contenus dans les cellules et dans leurs exosomes ont été extraits suivant la procédure modifiée de Bligh et Dyer précédemment décrite (Bligh & Dyer 1959) (Chan et al. 2012) et analysés en utilisant le système 6490 Triple Quadrupole LC/MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Les glycérophospholipides and les sphingolipides ont été séparés avec une HPLC de phase normale comme décrit précédemment (Chan et al. 2012), avec certaines modifications. Une colonne Agilent Zorbax Rx-Sil (diamètre interne 2,1 x 100 mm) a été utilisée avec les conditions suivantes : la phase A mobile (chloroforme:méthanol: 1 M hydroxyde d'ammonium, 89.9:10:0.1, v/v) et la phase mobile B (chloroforme:méthanol:eau:hydroxyde d'ammonium, 55:39.9:5:0.1, v/v); 95% de A pour 2 min, gradient linéaire de 30% sur 18 min et gardé pour 3 min, et gradient linéaire de 95% de A sur 2 min et gardé pour 6 min. Les stérols et les glycérolipides ont été séparés avec une HPLC à phase inverse en utilisant une phase mobile isocratique comme précédemment (Chan et al. 2012) excepté avec une colonne Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 100 mm).

Résultats

1. Les exosomes neuronaux se fixent spécifiquement aux neurones

Les résultats de cette partie sont présentés sous la forme d'un article publié en 2014 dans « *Journal of Extracellular Vesicles* » que je signe en co-premier auteur. Ma contribution personnelle a concerné (excepté les observations en microscopie électronique) la caractérisation des exosomes (**Figure 1 et 2**), une participation à la démonstration de la fixation des exosomes de N2a (**Figure 3**), la démonstration de la fixation des exosomes GFP-TTC sur les neurones et non pas sur les cellules gliales (**Figure 4**) et la réalisation de l'expérience de compétition des exosomes GFP-TTC avec la TTC soluble non GFP (**Figure 6**).

1.1. Contexte de l'étude

Il y a 5 ans le laboratoire a étudié la régulation de la sécrétion des exosomes neuronaux (Lachenal et al. 2011). Dans cette étude, l'équipe a observé l'association aux exosomes neuronaux d'une protéine recombinante composée de la partie C-terminale de la toxine du tétanos (TTC) fusionnée à une protéine fluorescente (GFP). La toxine du tétanos (TeNT) est composée de deux sous-unités : une chaîne lourde et une chaîne légère reliées par un pont disulfure. L'activité toxique endopeptidase de la toxine du tétanos se situe dans sa chaîne légère. La partie N-terminale de la chaîne lourde possède le domaine de translocation de la toxine dans le cytosol et la partie C-terminale comporte le domaine de fixation spécifique aux neurones. La TTC conserve la fixation neurospécifique de la TeNT mais ne possède ni l'activité endopeptidase, ni le domaine de translocation dans le cytoplasme de la toxine entière (Calvo et al. 2012).

La TeNT est une puissante neurotoxine sécrétée par la bactérie anaérobique *Clostridium tetani*. Cette exotoxine se fixe spécifiquement aux parties pré-synaptiques des neurones puis est endocytée (Matteoli et al. 1996). Le pH acide des endosomes provoque un changement structural de la protéine lui permettant de former un canal dans la membrane de l'endosome. La toxine est alors transloquée de l'endosome vers le cytoplasme où elle rencontre son substrat la synaptobrevine 2, également appelée VAMP2 (vesicular associated membrane protein). VAMP2 est une protéine SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*) vésiculaire (V-SNARE). Les SNARE sont des composants de la machinerie moléculaire permettant l'arrimage et la fusion des vésicules synaptiques. Le clivage de VAMP2 par la TeNT bloque la libération des

neurotransmetteurs. Suite à l'infection d'une plaie par *Clostridium tetani*, la TeNT se fixe au motoneurone où elle est endocytée et transportée de manière rétrograde. Un mécanisme moléculaire incompris permet le passage de la TeNT du motoneurone dans l'interneurone. Le clivage de VAMP2 dans l'interneurone bloque la sécrétion des neurotransmetteurs inhibiteurs provoquant une hyperexcitabilité des motoneurones générant une contraction musculaire appelée tétanie.

Nous avons étudié la fixation d'exosomes fluorescents sécrétés par des neurones corticaux de rat sur des cellules d'hippocampe de rat. Pour cela, la protéine recombinante soluble GFP-TTC produite au laboratoire (B. Blot) a été incubée sur des neurones corticaux. Les exosomes neuronaux GFP-TTC sécrétés après stimulation synaptique de 15 min ont été purifiés (**Figure 2**) et incubés 1h sur des cultures d'hippocampe de rat. Ces cultures sont composées de neurones d'hippocampe mais aussi de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglie). Nous avons observé que les exosomes neuronaux GFP-TTC ne se fixent qu'aux neurones (**Figure 4**), préférentiellement aux parties pré-synaptiques (**Figure 5**). La fixation neurospécifique sur les parties pré-synaptiques est caractéristique de la TeNT. Nous avons testé si la GFP-TTC associée aux exosomes permettait la fixation spécifique des exosomes GFP-TTC. Les exosomes GFP-TTC ont été incubés sur les neurones d'hippocampe préalablement incubés avec de la protéine soluble TTC non GFP. La fixation des exosomes GFP-TTC sur les neurones n'a pas été diminuée par la présence de TTC (**Figure 6**). L'absence de compétition entre la TTC soluble non GFP et les exosomes GFP-TTC montre que la spécificité de fixation des exosomes GFP-TTC n'est pas médiée par le GFP-TTC.

En parallèle du suivi des exosomes neuronaux, nous avons étudié la fixation d'exosomes fluorescents produits par une lignée de neuroblastomes de souris (N2a) sur les mêmes cellules d'hippocampe de rat. Les exosomes fluorescents de N2a ont été purifiés à partir du surnageant d'une lignée de N2a développée au laboratoire (M. Chivet) qui exprime de façon stable le marqueur des exosomes CD63 fusionné à la GFP (**Figure 1**). Nous avons observé que, contrairement aux exosomes neuronaux, les exosomes sécrétés par les N2a après une sécrétion constitutive de 48h se fixent aux neurones mais aussi aux cellules gliales (**Figure 3**).

1.2. **Neuronal exosomes binding specificities**

Pour une meilleure résolution des images voir : Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons.

Journal of Extracellular Vesicles

COACTION PUBLISHING

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons

Mathilde Chivet[1,2†‡], Charlotte Javalet[1,2‡], Karine Laulagnier[1,2], Béatrice Blot[1,2], Fiona J. Hemming[1,2] and Rémy Sadoul[1,2*]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U836, Grenoble, France; [2]Grenoble Institute of Neuroscience, University of Grenoble Alpes, Grenoble, France

Exosomes are nano-sized vesicles of endocytic origin released into the extracellular space upon fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane. Exosomes represent a novel mechanism of cell–cell communication allowing direct transfer of proteins, lipids and RNAs. In the nervous system, both glial and neuronal cells secrete exosomes in a way regulated by glutamate. It has been hypothesized that exosomes can be used for interneuronal communication implying that neuronal exosomes should bind to other neurons with some kind of specificity. Here, dissociated hippocampal cells were used to compare the specificity of binding of exosomes secreted by neuroblastoma cells to that of exosomes secreted by cortical neurons. We found that exosomes from neuroblastoma cells bind indiscriminately to neurons and glial cells and could be endocytosed preferentially by glial cells. In contrast, exosomes secreted from stimulated cortical neurons bound to and were endocytosed only by neurons. Thus, our results demonstrate for the first time that exosomes released upon synaptic activation do not bind to glial cells but selectively to other neurons suggesting that they can underlie a novel aspect of interneuronal communication.

Keywords: *extracellular vesicles*; *exosomes*; *neurons*; *multivesicular bodies*; *CD63 tetraspanin*; *tetanus toxin*; *central nervous system*; *intercellular communication*

Responsible Editor: Eva-Maria Krämer-Albers, Johannes Gutenberg University, Germany.

*Correspondence to: Rémy Sadoul, Chemin Fortuné Ferrini, Grenoble Institut des Neurosciences, BP 170, FR-38042 Grenoble, France, Email: remy.sadoul@ujf-grenoble.fr

Received: 22 April 2014; Revised: 16 September 2014; Accepted: 17 September 2014; Published: 13 November 2014

For the sake of clarity here, we define exosomes as extracellular vesicles having a diameter of 40–100 nm, which are released upon fusion of endosomes called multivesicular bodies (MVBs) to the plasma membrane. Exosomes were first described as a way for cells to discard unwanted material (1). It is now widely accepted that they also represent a novel mechanism of cell–cell communication by allowing intercellular transfer of proteins, lipids and RNAs (2). Many cell types can secrete exosomes, including cells from the central nervous system (CNS): microglia (3), oligodendrocytes (4,5), astrocytes (6) and neurons (7). Exosomes are found in cerebrospinal fluid, underlining the possibility of a secretion by nerve cells *in vivo* (8). In neurons, MVBs are found mainly in somato-dendritic compartments (9). Fusion of endosomes to the plasma membrane is a fundamental mechanism of synaptic plasticity allowing insertion of post-synaptic receptors and thereby reinforcing synaptic efficacy (10). We previously showed that neurons secrete exosomes. The endocytic origin of neuronal exosomes was demonstrated using a soluble recombinant protein, made of GFP fused with the C-terminal part of tetanus toxin (GFP–TTC), which was specifically endocytosed by neurons, passed through MVBs and constitutively released bound to exosomes. Exosome release was triggered by glutamatergic synaptic activation through calcium entering via N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors (11). The regulated secretion of neuronal exosomes might be a way for synapses undergoing plasticity to locally eliminate obsolete proteins and RNAs, without

†Current address: Dulbecco Telethon Institute, Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Centre for Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Trento, Italy.
‡These authors have contributed equally to this work.

Journal of Extracellular Vesicles 2014. © 2014 Mathilde Chivet et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 Unported License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/), permitting all non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

the need for dendritic transport to lysosomes mainly found in soma and proximal dendrites. It is tempting to speculate that exosomes released by neurons might also represent a novel way of intercellular communication within the nervous system (12). This idea has been reinforced by the finding that exosomes might mediate trans-synaptic transfer of Wnt1/Wingless proteins at the *Drosophila* neuromuscular junction to allow maturation of synapses (13,14). It was also recently shown, both *in vivo* and *in vitro*, that exosomes secreted by mouse oligodendrocytes can enter both microglial cells and neurons, and modify gene transcription of the latter (5,15,16). Exosomes have also been hypothesized to allow trans-synaptic communication and mediate spreading of pathogenic proteins like tetanus toxin, PrPsc, Tau, the amyloid Aβ or synuclein within the nervous system (13,17–19). The possible role of exosomes in interneuronal communication awaited the demonstration that exosomes secreted by neurons can be taken up by other neurons.

Here we have studied the binding of exosomes, secreted by N2a neuroblastoma cells and by primary cortical neurons, to dissociated hippocampal cells. We found that fluorescent exosomes released constitutively by N2a cells expressing GFP–CD63, bind both to neurons and glial cells and endocytosis could mainly be detected in glial cells. In contrast, GFP–TTC- labelled exosomes released by cortical neurons upon activation of glutamatergic synapses bound to and were internalized only by neurons but not by glial cells. Thus, our work showing that exosomes released by neurons upon synaptic activation are specifically transferred to neurons gives ground to the hypothesis that they might mediate interneuronal communication within the CNS.

Material and methods

Antibodies and reagents

Polyclonal anti-Alix has been previously described in Chatellard-Causse et al. (20). Monoclonal anti-LBPA (lyso-bis phosphatidic acid) was a kind gift from J. Gruenberg (University of Geneva, Switzerland). Monoclonal antibodies against EEA1 and against flotillin-1 were from Santa Cruz Biotechnology (sc6415) and BD Transduction Laboratories (610820), respectively. Monoclonal antibody against GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) was from Cell Signaling (#3670), polyclonal anti-Lamp-1 from Abcam (ab24170), monoclonal anti-MAP2 from Millipore (ab5622) and monoclonal anti-O4 was a kind gift from J.C. Deloulme (Grenoble Institute of Neuroscience, France). Monoclonal anti-PSD95 and anti-synaptophysin were purchased from Abcam (ab2723) and Sigma (S5768), respectively. Monoclonal anti-GFP for immunoblotting was from Covance (MMS-118R). For immuno-electron microscopy N2a exosomes were labelled with monoclonal anti-GFP (MMS-118R) and anti-CD63 from BD Pharmingen (556019). Polyclonal anti-GFP used to label exosomes carrying GFP–TTC was from Life Technologies (A11122), Protein-A gold was from CMC Utrecht. Bicuculline and 4-aminopyridine (4-AP) were purchased from Sigma. Wheat germ agglutinin (WGA) Alexa Fluor 594 conjugate was from Life Technologies.

pGEX plasmid coding for GST–GFP–TTC has been described in Bordet et al. (21). From this construct, TTC was amplified by PCR and cloned in a pGEX vector without the GFP. Both proteins, GST–GFP–TTC and GST–TTC were expressed in BL21 *E. coli* and purified on a glutathion-Sepharose4b column (Amersham) as described (21). After dialysis against phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5 M NaCl and 5% glycerol, proteins were centrifuged at 100,000 × g for 1 h to remove insoluble proteins.

GFP-CD63 N2a cell line

N2a cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS, Gibco), 2 mM L-glutamine and antibiotics (10 µg/ml streptomycin, 10 U/ml penicillin). N2a cells were transfected with a plasmid encoding GFP fused to CD63 (GFP-CD63) containing a G418 resistance gene (nptII). Cells expressing CD63 were selected using G418 at 0.4 mg/ml (Gibco). Several clones were isolated and one expressing GFP-CD63 was selected ($N2a^{GFP\text{-}CD63}$).

Primary cultures of cortical and hippocampal neurons

Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the French decree n°118 of 1st February 2013. Every effort was made to minimize the number of animals used.

Cells were prepared from embryonic rat embryos (E18 or E19) as described in Fauré et al. (7). Dissociated cortical neurons were seeded at 4.5×10^4 cells/cm^2 onto 100 mm dishes precoated with poly-D-lysine (50 µg/ml, Sigma). Hippocampal neurons were seeded at 1.2×10^4 cells/cm^2 on glass coverslips (14 mm diameter, Marienfeld, Germany) coated with 50-µg/ml poly-D-lysine. Cortical and hippocampal neurons were cultured in Neurobasal (Gibco) supplemented with 2% B27 (Gibco), 1 mM sodium pyruvate, and 2 mM L-glutamine, in a humidified incubator (37°C and 5% CO_2). Twenty-five per cent freshly made medium was added every 4 days. In the case of cortical neurons, 5 µM cytosine β-D-arabinoside (Ara-C, Sigma) was added to avoid glial cell proliferation. Immunostaining of cortical cultures after 15 days *in vitro* (DIV) with a monoclonal antibody against GFAP, revealed staining of only 1–2% of cells, demonstrating minimal contamination by astrocytes. In some cases, 5 µM Ara-C was also used for hippocampal neurons.

GST–GFP–TTC (GFP–TTC) fusion protein was diluted to 36 nM in culture medium and incubated on 15

DIV cortical neurons for 2 h. After extensive washes, the medium was replaced with K5 medium (5 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, 110 mM NaCl, 26 mM $NaHCO_3$, 1 mM NaH_2PO_4, 40 mM D-glucose, 15 mM HEPES, pH 7.4) containing 40 µM bicuculline and 100 µM 4-aminopyridine. The medium was harvested after 15 min to collect exosomes.

For WGA staining, hippocampal cells were incubated for 10 min at 37°C in K5 medium containing 5 µg/ml WGA-Alexa Fluor 594 before incubation with exosomes.

Purification of exosomes

Cell culture media were collected and a cocktail of protease inhibitors added (25X, tablets Complete EDTA, Roche). Media were cleared of debris by 2 successive centrifugation steps (2,000 × g for 10 min, 20,000 × g for 20 min) and filtration through a 0.22 µm filter (Millex GV PVDF, Millipore). Exosomes were recovered by centrifugation for 2 h at 100,000 × g (average speed, 29,000 rpm, SW32Ti). For density separation, 100,000 × g pellets were resuspended in 0.211 M sucrose, 3 mM imidazole pH 7.4, and loaded onto a continuous sucrose gradient (0.3–1.4 M).

Gradients were centrifuged for 18 h at 200,000 × g (bottom speed, 35,000 rpm, SW41Ti), and 10 fractions (1 ml) were collected. The sucrose density of each fraction was determined by refractometry. Fractions were divided into 2, diluted to 10 ml in 3 mM imidazole, pH 7.4, and centrifuged for 2 h at 200,000 × g (bottom speed, 35,000 rpm, SW41Ti). For one half, exosome pellets from fractions 1.1, 1.12 and 1.15 g/ml sucrose were resuspended in conditioned medium, pooled and used for incubation on hippocampal neurons (see below). Pellets obtained from the other half were resuspended in Laemmli buffer and used for Western blot analysis. Input corresponds to 10% of the solution before gradient separation; total cell lysates (TCL) were prepared using RIPA buffer and 10 µg of proteins loaded per lane.

GFP-CD63 containing exosomes were isolated from the cell culture supernatants of $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ cell line. Cells were washed twice in PBS and cultured in DMEM medium containing 10% foetal calf serum from which exosomes had been eliminated by ultracentrifugation (18 h, average speed, 35,000 rpm, 45Ti). Cell culture supernatants were collected after 24 h and exosomes isolated by 100,000 × g ultracentrifugation as described above.

Exosome incubation on hippocampal neurons

Hippocampal neurons (2×10^5) cultured on coverslips were incubated with exosomes secreted from 6.5×10^6 cortical neurons in a final volume of 200 µl. Incubation was done for the indicated times in a humidified incubator at 37°C and 5% CO_2. Cells were then extensively washed in medium before further processing for immunofluorescence or electron microscopy. GFP-CD63-exosomes secreted from 9×10^6 $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ cells were also incubated for the indicated times on 2×10^5 hippocampal neurons and then washed in medium.

Competition of GFP–TTC, or GFP–TTC-exosome binding with soluble TTC

Purified GST–TTC (referred to as TTC in the text) was used to compete with TTC–GFP or GFP–TTC-exosomes. TTC was diluted to 100 nM in culture medium and preincubated on 16 DIV hippocampal neurons for 20 min. GFP–TTC (0.36 nM) mixed with 100 nM TTC was then incubated on hippocampal neurons for 1 h. In the case of exosomes, GFP–TTC-exosomes were resuspended in incubation medium containing 100 nM TTC and incubated for 1 h on TTC-preincubated hippocampal cultures. Cells were then extensively washed in medium before further processing for immunofluorescence.

Immunofluorescence

N2a stably overexpressing GFP-CD63 were fixed at room temperature for 20 min using 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, permeabilized 30 min with 0.05% saponin in PBS-3% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma). Labelling with mouse anti-LBPA antibody was revealed using Cyanin 5-labelled anti-mouse antibody (Jackson Immunoresearch 0.2 µg/ml). Primary and secondary antibodies were diluted in PBS-3% BSA.

After incubation with exosomes, neurons were fixed using 4% PFA, 4% sucrose in PBS. After extensive washes in PBS, cells were permeabilized for 10 min at 4°C using PBS containing 0.1% Triton X-100. Cells were incubated in PBS containing 3% goat pre-immune serum (GPI, Sigma-Aldrich) and stained with the indicated primary antibodies and with secondary antibodies conjugated to either Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 or Cyanine 5 (Jackson Immunoresearch 0.2 µg/ml). Primary and secondary antibodies were diluted in PBS 1% GPI. Nuclei were stained with Hoechst (Sigma).

Coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem) and observed using epifluorescence (Axiovert 200 M, Zeiss) or confocal microscopy (LAS AF – TCS SPE, Leica or LSM 710, Zeiss using Zen software). Some figures show acquisition in one given plan, others present maximal intensity projections (cf. figure legends). Image files were processed with ImageJ.

Immunoelectron microscopy

In order to confirm the presence of GFP and CD63 on the exosomes secreted by the $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ cell line, the 100,000 × g pellet was resuspended in 2% PFA in PBS. Four microlitres were spotted onto Formvar-carbon-coated grids for 20 min, treated with PBS-glycine (50 mM) then PBS alone, before proceeding with immunolabelling according to the protocols described by Théry et al. (22). To reveal GFP inside exosomes, exosomal membranes were permeabilized by 0.05% saponin before consecutive

incubation with a mouse anti-GFP (45 min), a rabbit anti-mouse (30 min as a bridge) and finally a goat anti-rabbit 1.4 nm gold conjugated -Fab' (Nanoprobes, 1 h). The exosomes were then fixed for 5 min with 1% glutaraldehyde and finally treated with the HQ silver intensification kit (Nanoprobes) for 6 min before negative staining with uranyl acetate. To reveal CD63, grids were incubated successively with anti-CD63 (45 min), rabbit anti-mouse (as above) and protein-A gold conjugates (10 nm, 30 min). The exosomes were then fixed with 1% glutaraldehyde for 5 min and negatively stained.

In the case of GFP–TTC labelled exosomes, the exosomal pellet was resuspended in 50 µl PBS, and 4 µl were incubated on Formvar-carbon-coated grids for 20 min before fixation in 2% PFA in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 also for 20 min. The presence of GFP on the exosomes was then revealed using rabbit anti-GFP, for 30 min and protein-A gold, 10 nm, as described above.

To visualize by EM the binding of GFP–TTC exosomes on receiving neurons, exosomes were purified by 100,000 × g centrifugation from 5×10^7 cortical neurons (15 DIV) preincubated for 2 h with either GFP–TTC or GFP alone as a control. Pellets were resuspended in 300 µl, and exosomes incubated 1 h on hippocampal neurons before extensive washing in neurobasal medium. GFP was revealed by immunolabelling as follows: receiving neurons were fixed at room temperature for 90 min in pre-warmed 0.1 M phosphate buffered 2% glutaraldehyde, washed, treated with PBS glycine (50 nM), washed again and blocked with BSA (10 mg/ml). Anti-GFP (A11122) was then applied at 1/500 overnight, and revealed with protein-A gold (15 nm). The cells were fixed with 2% glutaraldehyde in phosphate buffer for 45 min, post-fixed with 1% osmic acid for 1 h before *en bloc* uranyl acetate treatment and embedding in Epon. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before observation with a Jeol JEM 1200EX transmission electron microscope.

Results

Exosome characterization

We used 2 approaches to fluorescently label exosomes in order to test their binding properties on hippocampal neurons. First, we developed a neuroblastoma cell line (N2a) expressing GFP-CD63 ($N2a^{GFP\text{-}CD63}$). CD63 is a tetraspanin strongly enriched in MVBs and in exosomes (23). As expected GFP labelling was massively concentrated inside LBPA-containing compartments (24) (Fig. 1A). Vesicles were pelleted from cell culture supernatant of $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ cells and gradient separation demonstrated the presence of GFP-CD63 in fractions having the density (1.09–1.14 g/ml) of exosomes and containing Alix and flotillin-1 (Fig. 1B) (25). Immunogold labelling with

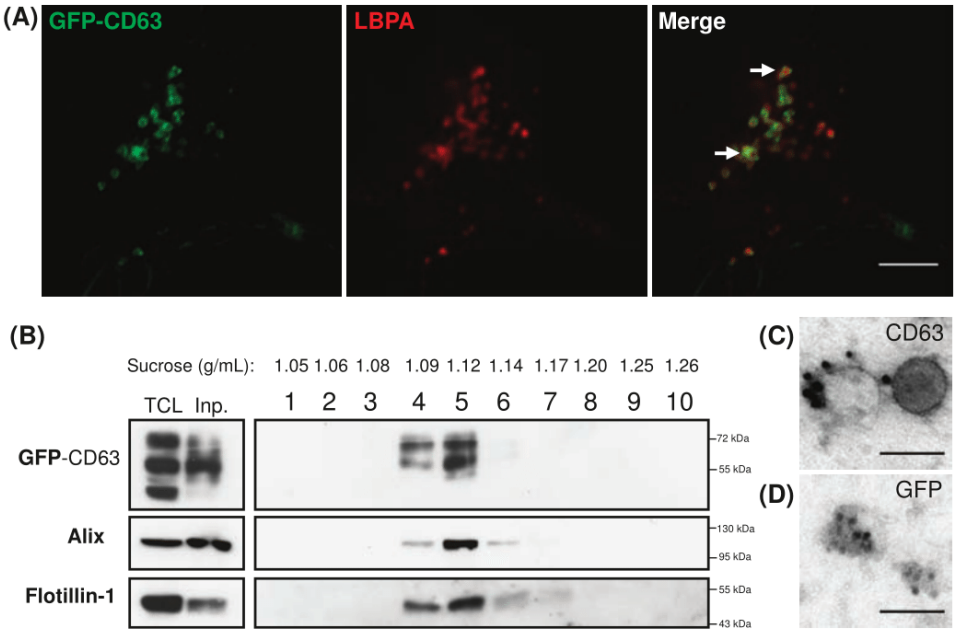


Fig. 1. N2a cells constitutively expressing GFP-CD63 ($N2a^{GFP\text{-}CD63}$) secrete exosomes containing the fusion protein. (A) Co-staining of $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ with anti-LBPA (red) shows that GFP-CD63 (green) is concentrated inside LBPA-containing multivesicular bodies (arrows). (B) Density separation of extracellular vesicles released by $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ cells; Western blot analysis using anti-GFP, anti-flotillin-1 and anti-Alix, shows GFP immunoreactivity in fractions containing exosomes. TCL: total cell lysates, Inp: input. (C, D) Immunogold labelling of vesicles secreted by $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ cells pelleted at 100,000 × g. Anti-CD63 labels the surface of intact exosomes (C), while anti-GFP stains the lumen of permeabilized exosomes (D). Scale bars: (A) 5 µm, (C, D) 100 nm.

an antibody against CD63 confirmed the presence of the tetraspanin on vesicles having the size and shape of exosomes (Fig. 1C). After permeabilization, anti-GFP immunogold labelling was seen inside exosomes showing that, as expected from the known conformation of the protein, the N-terminal part of CD63 points into the exosomal lumen (Fig. 1D).

Based on our previous work, we also used GFP–TTC to label neuronal exosomes. After 2 h incubation on cortical cells, the soluble bacterial recombinant GFP–TTC labelled neurons exclusively. Labelling was seen both on the surface and inside endosomes, some of which were labelled with the early endosomal marker EEA1 (Fig. 2A). GFP–TTC pre-labelled neurons were then extensively washed and incubated for 15 min in a medium containing bicuculline and 4-aminopyridine to trigger exosome release. Vesicles secreted during the 15 min incubation were harvested by ultracentrifugation and separated on a sucrose gradient. As seen in Fig. 2B, GFP–TTC protein could be detected in the exosome fractions containing flotillin-1 and Alix demonstrating that the soluble protein is bound to vesicles floating in sucrose at the density of exosomes. Immunoelectron microscopy using anti-GFP demonstrated that GFP–TTC was indeed bound to the surface of exosomes (Fig. 2C).

We then went on to compare binding to dissociated hippocampal cells, of GFP-CD63-exosomes secreted by neuroblastoma cells and GFP–TTC-exosomes secreted from cortical neurons.

Exosomes from neuroblastoma cells bind indifferently to neurons and glial cells

GFP-CD63 exosomes purified from N2a$^{GFP\text{-}CD63}$ cell culture supernatant were incubated on mixed cultures of hippocampal cells (14 DIV) which contain neurons, astrocytes and oligodendrocytes as detected using antibodies against MAP2, GFAP and O4, respectively (Fig. 3). GFP-CD63 exosomes were bound to the surface of all cells with no apparent preference for any cell types. Co-staining with anti-Lamp-1 demonstrated the presence of GFP-CD63 inside Lamp-1-positive late endosomes of astrocytes or oligodendrocytes. In contrast, GFP-CD63 was very rarely seen inside Lamp-1-positive compartments of neurons. Thus, exosomes released by neuroblastoma cells indiscriminately bind to neurons and glial cells, and are mainly, but not exclusively, taken up by the latter.

Exosomes from cortical neurons bind to neurons only

We next tested the binding on mixed cultures of hippocampal cells (14 DIV) of GFP–TTC exosomes released by cortical neurons upon synaptic activation. Exosomes secreted from cortical neurons, which had endocytosed GFP–TTC, were separated on sucrose gradients (pooled

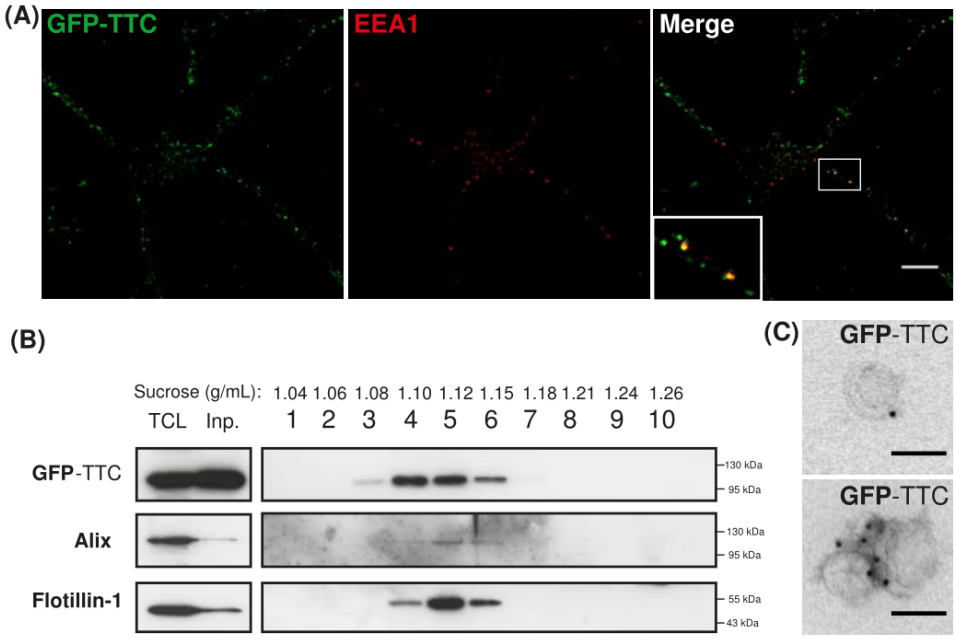


Fig. 2. Soluble GFP–TTC is endocytosed before being secreted via neuronal exosomes. Cortical neurons were incubated at 37°C with GFP–TTC for 2 h (36 nM). (A) Confocal microscopy of neurons stained with anti-EEA1 (red), shows that GFP–TTC proteins (green) bind to and are endocytosed by neurons. (B) Density separation of extracellular vesicles secreted during a 15 min treatment with bicuculline and 4-AP; Western blot analysis using anti-GFP, anti-flotillin-1 and anti-Alix, shows GFP immunoreactivity in fractions containing exosomes. TCL: total cell lysates, Inp: input. (C) Immunogold labelling with anti-GFP of vesicles pelleted at 100,000 × g demonstrates the presence of GFP–TTC on the exosomal surface. Scale bars: (A) 10 µm (C) 100 nm.

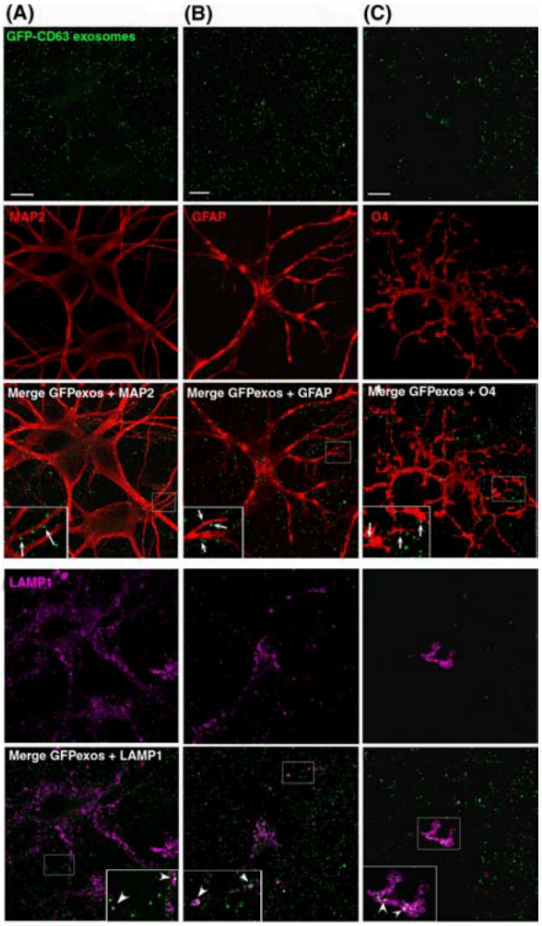


Fig. 3. Neuroblastoma exosomes carrying GFP-CD63 bind to and are endocytosed by neurons and glial cells. Exosomes released by $N2a^{GFP\text{-}CD63}$ cells were resuspended in conditioned medium and incubated for 1 h on mixed primary culture of hippocampal neurons (14 DIV). After washing, cells were co-stained with antibodies against MAP2 (A), or GFAP (B), or O4 (C), to label neurons, astrocytes and oligodendrocytes, respectively, and with antibodies against Lamp-1 (A, B, C) to stain late endosomes and lysosomes. Arrows point to exosomes bound on the cell surface. Arrowheads point to colocalization of exosomes with Lamp-1. Stacks of 3 confocal sections inside cells are shown for all conditions. Scale bars: 10 μm.

fractions 4, 5, 6 in Fig. 2B). This purification step made sure that all GFP–TTC was bound to exosomes and precluded any contamination with soluble GFP–TTC. As seen in Fig. 4A, GFP–TTC-exosomes exclusively decorated MAP2-positive soma and dendrites and did not bind to MAP2 negative cells of the same field. Co-staining with anti-GFAP antibodies further demonstrated that GFP–TTC exosomes bind only to MAP2 positive neurons and not to GFAP positive astrocytes (Fig. 4B). EM observation using immunogold against GFP of hippocampal neurons incubated with exosomes, confirmed the presence of single (Fig. 4C, left panel) or of aggregated exosomes (Fig. 4C, right panel) bound to the neuronal surface.

GFP–TTC exosomes bound to neurons are often concentrated in patches, reminiscent of synapses. Immunolabelling of neurons decorated by GFP–TTC-exosomes with antibodies against synaptophysin and PSD95 was used to label pre- and post-synaptic sites, respectively. As illustrated in Fig. 5, some fluorescent patches corresponding to GFP–TTC exosomes co-localized with synaptophysin (Fig. 5A) and juxtaposed with PSD95 (Fig. 5B), demonstrating that neuronal exosomes bind to pre-synaptic parts. Noteworthy is that GFP–TTC-exosomes bound only to a small fraction of the immunolabelled synapses.

In another set of experiments, we used hippocampal neurons preincubated for 10 min with WGA coupled to Alexa-Fluor 594 in order to allow endocytosis of the fluorescent lectin and labelling of endosomes. After 1 h incubation with GFP–TTC exosomes, fluorescence accumulated in WGA-stained intracellular puncta of some neurons (Fig. 5C). Thus, GFP–TTC-exosomes bind to presynaptic terminal parts of some neurons and can be endocytosed.

With GFP–TTC being on the surface of neuronal exosomes, it was conceivable that it might mediate the binding of exosomes to TTC receptors of the neuronal surface. In order to test whether this is the case, we used unlabelled purified TTC to compete for the binding of GFP–TTC-exosomes. As seen in Fig. 6, purified TTC abolished the binding of soluble GFP–TTC to hippocampal neurons (Fig. 6A and B), whereas it had no apparent effect on the binding of GFP–TTC exosomes (Fig. 6C and D). This result confirmed that the fluorescence detected on the surface of neurons incubated with GFP–TTC-exosomes is not due to soluble GFP–TTC and that GFP–TTC present on the exosomes does not mediate binding of the exosomes to the surface of hippocampal neurons.

Discussion

In this work, we have compared the binding to dissociated rat hippocampal cells, of fluorescent exosomes released by neuroblastoma cells and of exosomes secreted by neurons. We found that GFP-CD63-exosomes from N2a cells bound to both neurons and glial cells. In sharp contrast, GFP-TTC labelled neuronal exosomes released upon synaptic activation bound only to neurons, preferentially presynaptically.

GFP-CD63 labelled exosomes have already been used to demonstrate the transfer of exosomes between Schwann cells or mesenchymal stromal cells and neurons (26). Immunoelectron microscopy allowed the authors to show that Schwann cell-derived GFP-CD63-exosomes accumulated inside endocytic vesicles of axons. In our case, GFP-CD63-exosomes from neuroblastoma cells bound

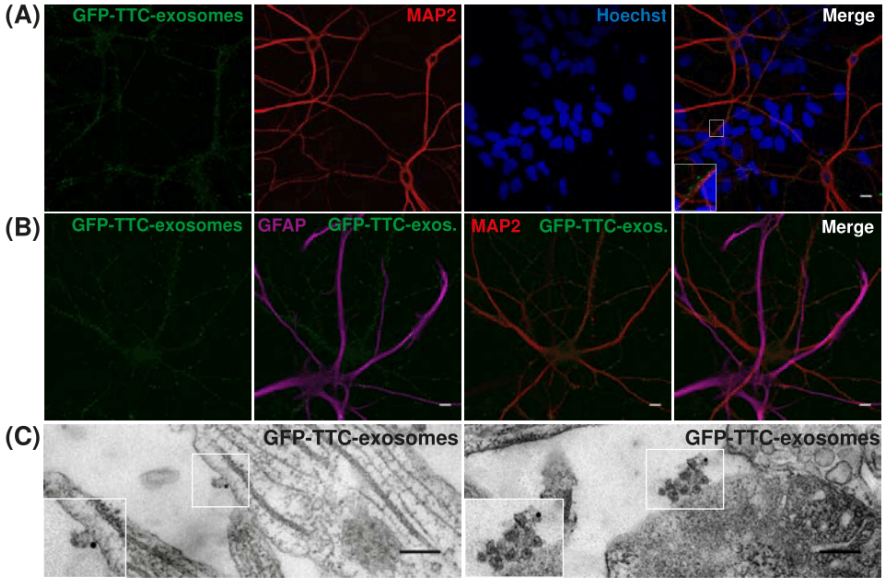


Fig. 4. Neuronal exosomes bearing GFP–TTC bind specifically to neurons. (A) Exosomes released by cortical neurons pre-incubated with GFP–TTC were harvested, pelleted at 100,000 × g and separated on a sucrose gradient. Three GFP–TTC containing fractions (sucrose density of 1.1–1.15 g/ml) were pooled, pelleted, resuspended in incubation medium and incubated for 1 h on hippocampal cell cultures (16 DIV) (A, B, C). A) After washing, cells were immunostained with anti-MAP2 antibody (red) to label neurons. Hoechst nuclear staining shows the presence of numerous MAP2 negative cells which are not stained with GFP–TTC exosomes (maxima intensity). (B) After washing, cells were immunostained with anti-MAP2 antibody (red) to label neurons and anti-GFAP to stain astrocytes (magenta). (C) Cells were washed and processed for immunogold labelling using anti-GFP and processed for EM observation. Single or aggregated exosomes carrying gold-labelled GFP–TTC can be seen on the surface of neurons. Scale bars: (A, B) 10 μm, (C) 500 nm.

to the surface of hippocampal neurons and were sometimes internalized. However, endocytosis mainly occurred in astrocytes and oligodendrocytes, where exosomes or their cargoes accumulated in late endosomes or even lysosomes.

The fate of neuroblastoma exosomes was very different from that of exosomes released by neurons upon synaptic activation, which bound only to neurons, preferentially at their synapses. Based on our previous work, we made use of GFP–TTC to label neuronal exosomes and follow their binding on hippocampal cells. TTC corresponds to the C-terminal 451-amino-acid fragment of the Tetanus toxin (TeNT) heavy chain, which allows specific binding and endocytosis of the holotoxin by neurons (27). Binding of TTC to the neuronal surface requires interaction of 2 carbohydrate binding sites to gangliosides and with a protein receptor, the identity of which remains a matter of debate (28,29). We already reported that endocytosed GFP–TTC can be detected in neuronal MVBs and is released by way of exosomes during long-term depolarization. Since GFP–TTC binds to and is endocytosed exclusively by neurons, the use of this soluble fluorescent protein is a unique tool to specifically label exosomes released by neurons and follow their binding to other cells. Here, we stimulated fast release of exosomes using bicuculline, which indirectly activates glutamatergic synapses and thereby massively triggers exosomal release (11). GFP–TTC labelled exosomes were harvested during a 15 min stimulation of cortical neurons having endocytosed GFP–TTC and further purified by density centrifugation. When incubated on dissociated hippocampal cells these GFP–TTC-exosomes stained dendrites and soma of neurons but did not bind to glial cells present in the same cultures. Fluorescent labelling of neurons by the exosomes was not due to GFP–TTC, either free or bound to exosomes, interacting with its neuronal surface receptor. Indeed labelling was not abolished when GFP–TTC-exosomes were co-incubated with unlabelled TTC. Thus, GFP–TTC on the exosomal surface, probably bound by gangliosides known to be enriched in exosomes, does not bind to the surface of hippocampal neurons and therefore does not underlie the neuron specific binding of exosomes. Interestingly, binding of exosomes occurred mainly at presynaptic parts of synapses and GFP fluorescence was also detected in the soma of some neurons, implying that endocytosis of the exosomes or of their cargoes had occurred. Hence, our results show that exosomes released post-synaptically by cortical neurons upon activation of synaptic NMDA receptors can bind presynaptically to hippocampal neurons. Future work will be required to examine whether exosomes can be endocytosed at these sites and transported

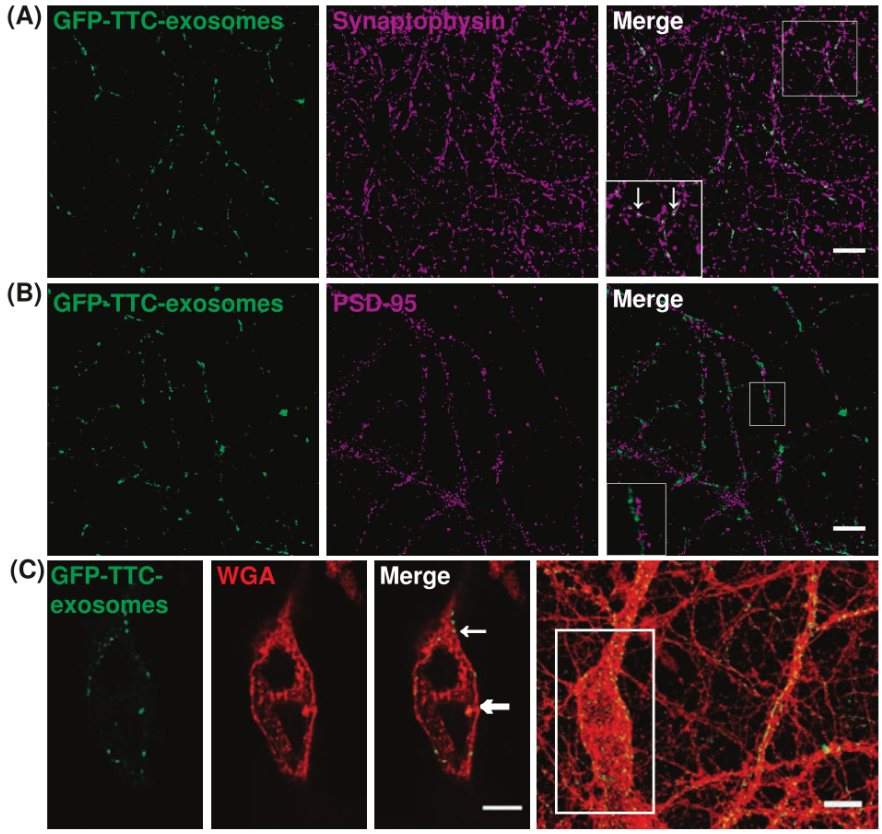


Fig. 5. Neuronal exosomes bearing GFP–TTC preferentially bind to pre-synaptic terminals and can be internalized. Exosomes secreted by cortical neurons preincubated with GFP–TTC (green) were incubated for 1 h on hippocampal neurons (22 DIV), which were then immunostained with (A) anti-synaptophysin (magenta) or (B) anti-PSD95 (magenta). Confocal microscopy sections show patches of GFP–TTC exosomes (green) perfectly colocalized with some synaptophysin-positive presynaptic sites and juxtaposed with some PSD95-positive post-synaptic sites. Scale bars: (A, B, C) 10 μm. (C) GFP–TTC exosomes were incubated for 1 h on hippocampal neurons (21 DIV) preincubated with Alexa594-WGA for 10 min at 37°C to label endosomes. (A), (B) (C) are confocal sections except for the photo on the right of the (C) panel, representing the projection of maximal intensities. Thin and bold arrows show labelling on the surface and within the cytoplasm respectively.

back to the soma. Noteworthy, was the heterogeneity of staining of the MAP2 positive soma and dendrites with about 20% being strongly labelled while on the opposite, some were barely decorated by exosomes. Hippocampal neurons are heterogeneous by nature and future work is now needed to try to understand which type of neurons are the specific targets of cortical exosomes and how such a specificity of binding can be achieved.

Using GFP-CD63- and especially GFP–TTC-containing exosomes, punctate fluorescent staining could be seen in the neuronal cytoplasm, suggesting uptake of exosomes. Noteworthy is the fact that the intracellular fluorescent staining of neurons was scarce compared to the heavy surface labelling. Increasing the incubation time of the exosomes to 3 h slightly reduced the surface labelling but did not significantly increase the intraneuronal staining (not shown). This scarcity of internalization by neurons precluded the identification, by immunocytochemistry or immunoelectron microscopy, of the endosomal compartments containing labelled exosomes or their cargoes. In contrast, massive endocytosis by some glial cells, including astrocytes, was observed using GFP-CD63-exosomes. In these cells, accumulation of fluorescence was detected in Lamp-1 positive late endosomes and lysosomes suggesting that the exosomes or their cargoes are targeted towards degradation. It has recently been shown that exosomes secreted by an oligodendrocyte precursor cell line are preferentially taken up and degraded by microglial cells, whereas exosomes secreted from differentiated oligodendrocytes can be taken up by cortical neurons, microglial cells but not by astrocytes. Using transduction of oligodendrocytes with recombinant Adeno-Associated Virus/Myelin BasicPprotein (AAV/MBP-Cre), Frühbeis et al. found that the recombinase was active in receiving neurons, suggesting that exosome cargoes escape degradation inside neurons (15). These results, combined with ours using neuronal exosomes, suggest that exosomes secreted by different cell types of the nervous system

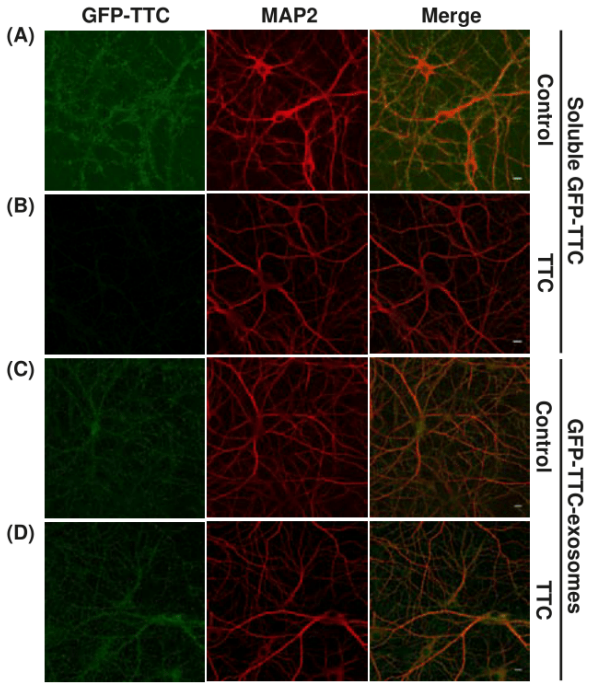


Fig. 6. GFP–TTC exosomes do not bind to the neuronal surface because of their TTC cargo. (A, B) Incubation with TTC abolishes GFP–TTC staining of neurons: GFP–TTC was diluted to 0.36 nM in culture medium and incubated for 1 h on 16 DIV hippocampal neurons in absence (A) or in presence (B) of 100 nM TTC. In B) cells were pre-incubated for 20 min with 100 nM TTC. (C, D) TTC does not impair binding of GFP–TTC-exosomes to neurons: GFP–TTC-exosomes were incubated for 1 h on 16 DIV hippocampal neurons in absence (C) or in presence (D) of 100 nM TTC. In D) cells were pre-incubated for 20 min with 100 nM TTC. After incubation, cells were washed, fixed and immunolabelled with anti-MAP2 (red) (A, B, C and D). Scale bars: 10 μm.

have different cell-binding specificities and fates once internalized by receiving cells.

Our results showing that exosomes released upon activation of glutamatergic synapses preferentially bind to other neurons strengthen the hypothesis that exosomes might represent a novel way for interneuronal communication. Trans-synaptic transfer of exosomes suggested by our observation that neuronal exosomes mainly bind presynaptically, could lead to the entry of exosomal membrane proteins into the endosomal protein pool, and possible local modifications of the cell surface properties of afferent neurons. Release into the cytosol of the exosome content, including signal transduction molecules and miRNAs could modulate local synaptic transmission. More work is now required to test how trans-synaptic transfer of exosomes might affect synaptic plasticity and participate in the spreading of pathogenic proteins across the nervous system in the course of neurodegenerative pathologies such as Alzheimer or Parkinson's diseases.

Acknowledgements

All members of the laboratory are acknowledged for ideas, support and comments on the manuscript.

Conflict of interest and funding

The authors declare no conflict of interest. M.C. and C.J. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. K.L. was supported by the Foundation Plan Alzheimer. This work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Joseph Fourier, Foundation France Alzheimer and ANR MALZ 2011 and ANR Blanc 2008 programs.

References

1. Vidal M, Mangeat P, Hoekstra D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. J Cell Sci. 1997;110:1867–77.
2. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 2013;200:373–83.
3. Potolicchio I, Carven GJ, Xu X, Stipp C, Riese RJ, Stern LJ, et al. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. J Immunol. 2005;175:2237–43.
4. Krämer-Albers E-M, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Möbius W, Berger H, et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: trophic support for axons? Proteomics Clin Appl. 2007;1:1446–61.
5. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. J Cell Sci. 2011;124:447–58.
6. Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. Dev Neurobiol. 2007;67:1815–29.
7. Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. Mol Cell Neurosci. 2006;31:642–8.
8. Vella LJ, Greenwood DL, Cappai R, Scheerlinck JP, Hill AF. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. Vet Immunol Immunopathol. 2008;124:385–93.
9. Von Bartheld CS, Altick AL. Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. Prog Neurobiol. 2011;93:313–40.
10. Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Karcher R, Li X-D, et al. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. Cell. 2008;135:535–48.
11. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. Mol Cell Neurosci. 2011;46:409–18.
12. Chivet M, Javalet C, Hemming F, Pernet-Gallay K, Laulagnier K, Fraboulet S, et al. Exosomes as a novel way of interneuronal communication. Biochem Soc Trans. 2013;41:241–4.
13. Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R, Gherbesi N, et al. Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. Cell. 2009;139:393–404.
14. Koles K, Nunnari J, Korkut C, Barria R, Brewer C, Li Y, et al. Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. J Biol Chem. 2012;287:16820–34.

15. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. PLoS Biol. 2013;11:e1001604.
16. Fröhlich D, Kuo WP, Frühbeis C, Sun J, Zehendner CM, Heiko J, et al. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014;369:20130510.
17. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? Front Physiol. 2012;3:124.
18. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. J Neurosci. 2010;30:6838–51.
19. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, et al. Cells release prions in association with exosomes. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:9683–8.
20. Chatellard-Causse C, Blot B, Cristina N, Torch S, Missotten M, Sadoul R. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. J Biol Chem. 2002;277:29108–15.
21. Bordet T, Castelnau-Ptakhine L, Fauchereau F, Friocourt G, Kahn A, Haase G. Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. Mol Cell Neurosci. 2001;17:842–54.
22. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol. 2006;Chapter 3: Unit 3.22.1–3.22.29.
23. Escola J, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. J Biol Chem. 1998;273:20121–7.
24. Kobayashi T, Vischer UM, Rosnoblet C, Lindsay M, Parton RG, Kruithof EKO, et al. The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. Mol Biol Cell. 2000;11:1829–43.
25. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. Biochim Biophys Acta. 2012;1820:940–8.
26. Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. Stem Cells. 2012;30:1556–64.
27. Rossetto O, Scorzeto M, Megighian A, Montecucco C. Tetanus neurotoxin. Toxicon. 2013;66:59–63.
28. Chen S, Hall C, Barbieri JT. Substrate recognition of VAMP-2 by botulinum neurotoxin B and tetanus neurotoxin. J Biol Chem. 2008;283:21153–9.
29. Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, Binz T. Two carbohydrate binding sites in the HCC-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. J Mol Biol. 2003;326:835–47.

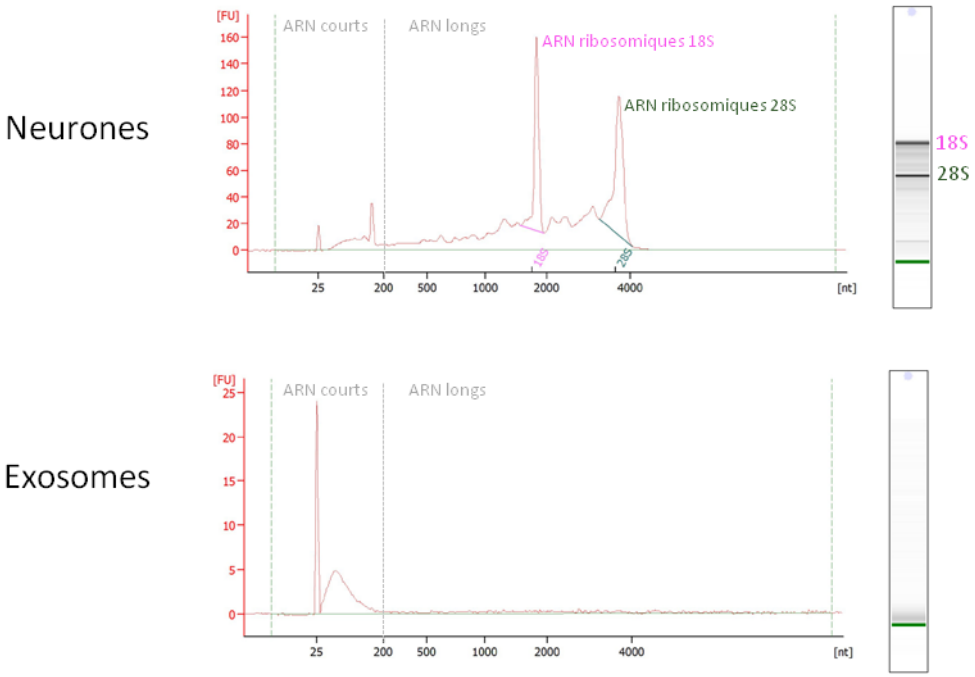


Figure 19 : les exosomes neuronaux ne contiennent que des ARN courts. Profil au Bioanalyzer (Agilent Technology) des ARN totaux des neurones corticaux et de leurs exosomes sécrétés après stimulation synaptique glutamatergique de 15 min.

2. Le miRNome des neurones et de leurs exosomes

Nous nous sommes intéressés à la composition en ARN des exosomes sécrétés par des neurones après stimulation des synapses glutamatergiques. Après avoir observé que ces exosomes ne contiennent que des ARN courts, nous avons réalisé un séquençage à haut débit des microARN contenus dans les neurones sans stimulation et après stimulation et dans les exosomes sécrétés par les neurones stimulés. Le séquençage a été réalisé en collaboration avec le laboratoire d'A. Buck de l'Université d'Edimbourg.

2.1. Les exosomes neuronaux ne contiennent que des ARN courts

Nous avons étudié la composition en ARN des exosomes neuronaux purifiés à partir d'une culture primaire de neurones corticaux matures (15 jours de culture). La sécrétion des exosomes a été stimulée pendant 15 min par un traitement à la bicuculline qui active indirectement les synapses glutamatergiques. Le surnageant cellulaire a ensuite été collecté et traité à la RNAase A dans le but d'éliminer les ARN contaminants, non protégés dans les exosomes (Valadi et al. 2007). Puis les exosomes ont été purifiés et les ARN totaux contenus dans les exosomes ont été extraits ainsi que ceux contenus dans les neurones ayant sécrétés les exosomes.

Les ARN neuronaux et ceux contenus dans leurs exosomes ont été analysés sur Picopuce au Bioanalyzer (Agilent Technologies). Cette technique permet de réaliser une électrophorèse miniature des ARN en fonction de leur taille. Plus les ARN sont courts plus leur migration est rapide.

Le profil en ARN des neurones permet de détecter des ARN courts (<200 nt) et des ARN longs (>200 nt) incluant des ARN messager (ARNm) et les ARN ribosomiques 18S (1900 nt) et 28S (4800 nt). Le profil des ARN contenus dans les exosomes neuronaux montre que les exosomes ne contiennent que des ARN courts (<200 nt) (**Figure 19**). Cette analyse a été reproduite à partir de cultures primaires de neurones corticaux indépendantes et n'a jamais révélé la présence d'ARN long dans les exosomes neuronaux (n=5). Ces résultats suggèrent que les exosomes neuronaux sécrétés après stimulation synaptique glutamatergique ne contiennent que des ARN courts (<200 nt).

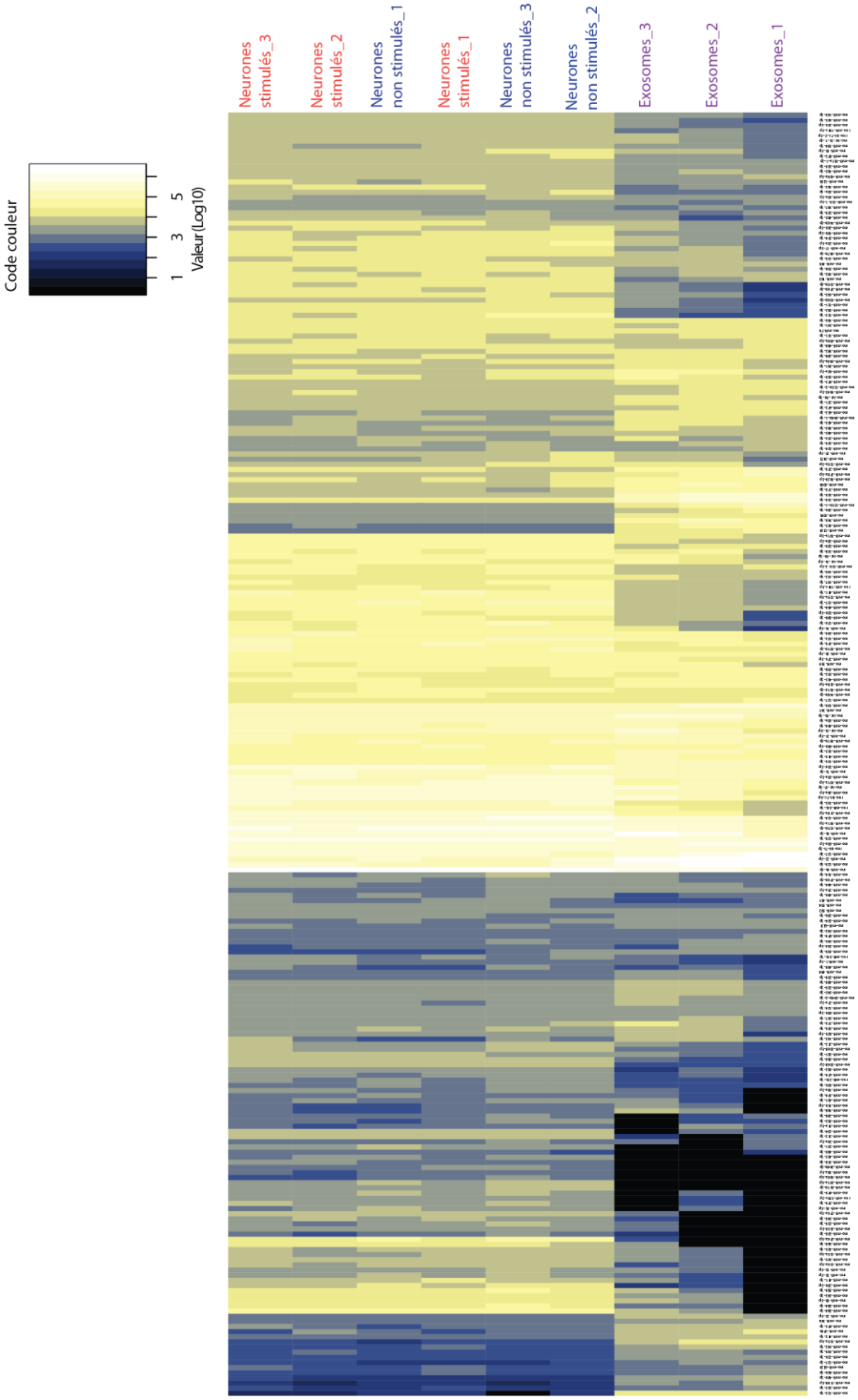


Figure 20 : *heatmap* comparant le taux d'expression des microARN contenus dans les neurones stimulés ou non et dans les exosomes de neurones stimulés. Abondance normalisée, seuil à 0.01%.

2.2. La stimulation synaptique ne modifie pas l'expression des microARN

Il a été montré que l'activité neuronale diminué spécifiquement le taux d'expression de certains microARN matures selon un mécanisme qui reste inconnu (Krol 2010). Pour savoir si la stimulation à la bicuculline est capable de modifier les microARN dans les neurones, nous avons comparé la composition en microARN de neurones stimulés et non stimulés. Pour cela, des neurones corticaux matures (15 jours de culture) ont été stimulés ou non par un traitement de 15 min à la bicuculline. Après extraction des ARN totaux, la composition en microARN des neurones à été obtenue par séquençage à haut débit. Pour permettre une analyse statistique, l'expérience a été réalisée à partir de trois cultures primaires de neurones indépendantes (n=3).

Les profils en *heatmap* ne montrent pas de différence d'expression des microARN entre les neurones stimulés et non stimulés (**Figure 20**). Le *heatmap* est une représentation graphique qui permet ici de visualiser par une couleur le taux d'expression de chaque microARN. Les microARN très abondants sont codés en blanc alors que les microARN peu exprimés sont représenté par une couleur foncée. Cette observation a été confirmée par l'analyse statistique qui n'a pas mis en évidence de différence significative du taux d'expression de chacun des microARN entre les neurones stimulés ou non. Ce résultat montre que la stimulation synaptique glutamatergique à court terme ne provoque pas de diminution de l'expression de microARN dans les cultures primaires de neurones corticaux matures.

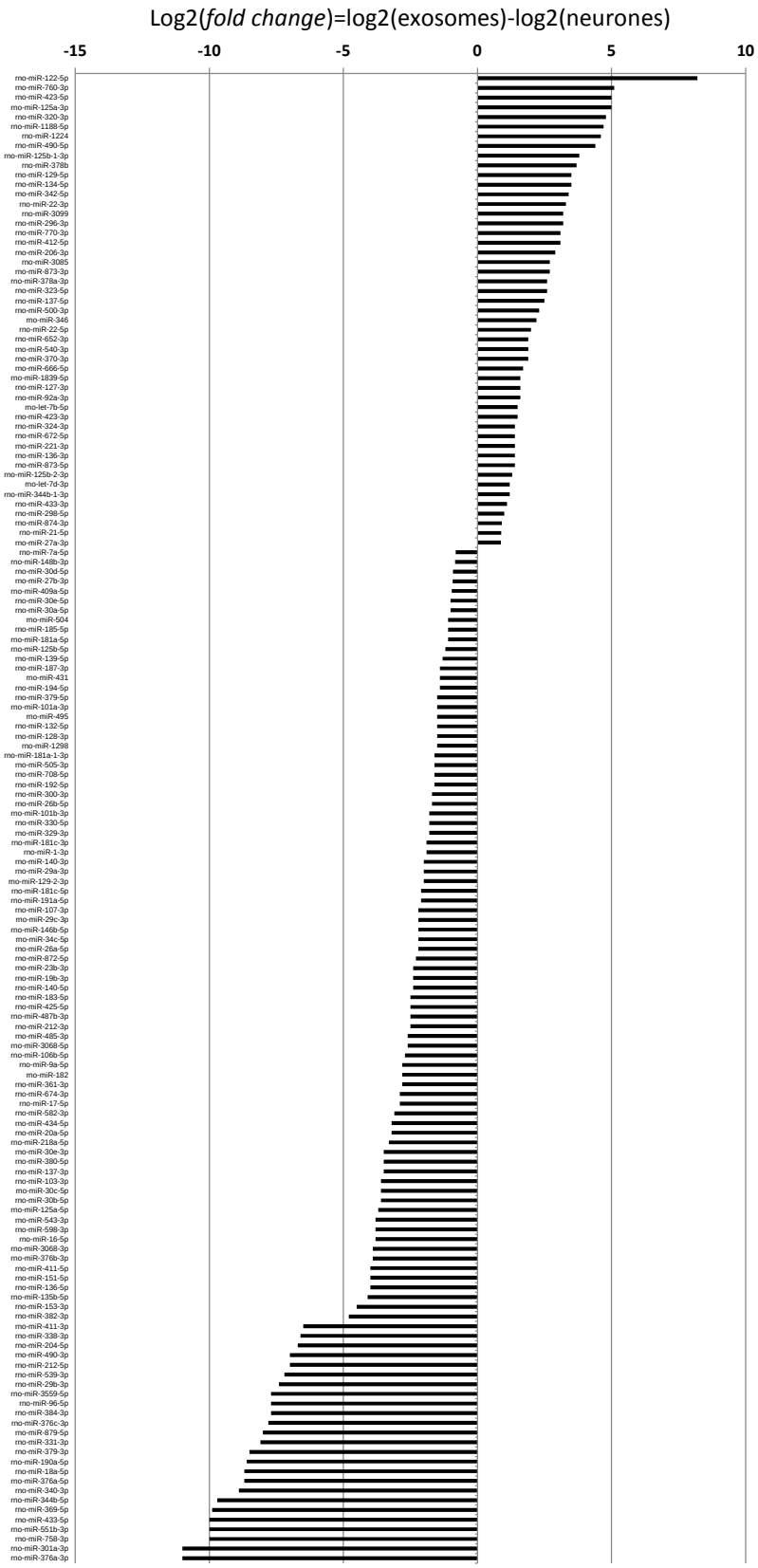


Figure 21 : 154 microARN sont exprimés différemment entre les neurones et leurs exosomes. Analyse statistique : test de Student, p-valeur ajustée < 0.05, n=3 cultures de neurones indépendantes.

2.3. **Composition en microARN des exosomes**

Nous avons étudié la composition en microARN des exosomes neuronaux et nous l'avons comparée à celle des neurones stimulés ayant sécrétés les exosomes. Les exosomes ont été purifiés à partir de neurones corticaux matures stimulés pendant 15 min par un traitement à la bicuculline. Le surnageant cellulaire a ensuite été collecté et traité à la RNAase A. Après extraction des ARN totaux, la composition en microARN des exosomes et des neurones à été obtenue par séquençage à haut débit. Pour permettre une analyse statistique, l'expérience a été réalisée à partir de trois cultures primaires de neurones indépendantes (n=3).

Les profils en *heatmap* montrent de nombreuses différences d'expression des microARN entre les neurones stimulés et leurs exosomes (**Figure 20**). Par exemple, les microARN les plus abondants dans les exosomes sont les miR-129-5p et le miR-22-3p mais ne sont pas les plus abondants dans les neurones.

Le taux d'expression de chaque microARN entre les neurones et les exosomes a été comparé en calculant le *fold change* (taux de changement) de chaque microARN entre les neurones stimulés et leurs exosomes tel que :

Log2 (*fold change*) = Log2 (exosomes) – Log2 (neurones).

Par conséquent, un *fold change* égal à 0 signifie que le microARN a le même taux d'expression entre les exosomes et les neurones ; un f*old change* positif signifie que le microARN est enrichi dans les exosomes et *à contrario*, un *fold change* négatif signifie que le microARN est appauvri dans les exosomes.

Le taux d'expression moyen de chaque microARN a été calculé à partir des taux d'expression obtenus pour chacune des 3 expériences (n=3) réalisées à partir des cultures primaires indépendantes. L'analyse statistique a révélé que 154 microARN ont un taux d'expression significativement différents entre les neurones stimulés et leurs exosomes (**Figure 21**) : 49 microARN sont enrichis dans les exosomes (jusqu'à 300 fois) et 105 microARN sont appauvris dans les exosomes (plus de 2000 fois). Ces résultats montrent que les microARN sont sélectivement exportés dans les exosomes de neurones sécrétés après une brève stimulation synaptique glutamatergique.

2.4. **hnRNPA2B1 ne régule pas l'export des microARN dans les exosomes neuronaux**

Un mécanisme du contrôle des microARN exportés dans les exosomes a été mis en évidence en 2013. Les auteurs ont montré que la sumoylation de la protéine hnRNPA2B1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B21*) contrôle le chargement dans les exosomes de lymphocytes T des microARN qui contiennent un motif ARN spécifique appelé « EXO-motif » (Villarroya-Beltri et al. 2013).

Les hnRNPs constituent une large famille de protéines capables de s'associer avec des ARNs. Cette famille comprend 20 protéines majeures, de la protéine hnRNPs A1 à U avec des tailles allant de 34 à 120 kDa. Chaque hnRNP protéine contient au moins un motif de fixation aux ARNs tel que RRM (RNA recognition motif), KH (hnRNP K homology domain) ou RGG (arginine/glycine-rich box). De nombreuses fonctions ont été décrites pour les hnRNPs protéines : maintenance et recombinaison de l'ADN, transcription et *processing* des transcrits primaires, export nucléaire, localisation subcellulaire, traduction et stabilité des ARNm matures. Les hnRNPS A/B sont les plus petites hnRNP mais surtout les plus abondantes. L'ARN pré-messager A2/B1 est alternativement épissé pour produire 4 isoformes : B1 (tous les exons), A2 (exclu l'exon 2), B1b (exclu l'exon 9) et A2b (exclu les exons 2 et 9). La forme A2/B1 fait référence à une zone conservée entre ces 4 isoformes.

Dans les neurones, il a été montré que l'exon 2 et/ou l'exon 9 conduit à la rétention de hnRNP dans le noyau, c'est pourquoi l'isoforme A2b (qui ne possède pas les exons 2 et 9) est la forme prédominante dans le cytoplasme. Le niveau d'expression d'A2b est régulé pendant le développement et est dépendant de l'espèce. A2B1 est exprimée dans des neurones d'hippocampe de rat mais sa localisation évolue avec la maturation. A 6 DIV, tout l'A2B1 est dans le noyau. Le niveau du marquage A2B1 cytoplasmique augmente entre DIV8 et DIV14 (Han et al. 2010).

Une étude protéomique a détecté la présence de la protéine hnRNPA2B1 dans les exosomes d'une lignée cellulaire humaine de neuroblastomes (SH-SY5Y) différenciés en neurones par un traitement à l'acide *trans* rétinoïque (Goldie et al. 2014).

Nous avons testé si ce mécanisme du contrôle des microARN exportés dans les exosomes était retrouvé dans les neurones corticaux. Tout d'abord, nous avons analysé les séquences nucléotidiques des microARN enrichis dans les exosomes neuronaux et observé que 92% d'entre elles possédaient au moins un des EXO-motif décrits par Vollarroya-Beltri et collaborateurs (**Figure 22 a et b**). Puis, à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la forme A2/B1, nous avons cherché la présence de la protéine hnRNPA2B1 dans les exosomes neuronaux. La protéine a bien été retrouvée dans le lysat cellulaire des neurones corticaux mais ne semble pas être exportée dans leurs exosomes (**Figure 22c**). Le mécanisme du contrôle des microARN exportés dans les exosomes neuronaux n'est donc pas contrôlé par hnRNPA2B1.

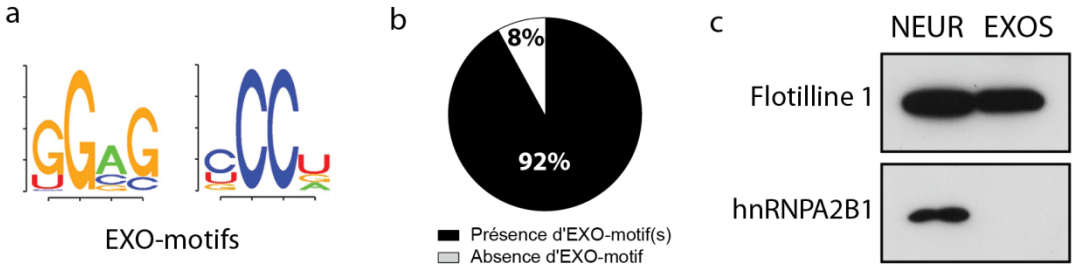


Figure 22 : le mécanisme du contrôle des microARN exportés dans les exosomes neuronaux n'est pas contrôlé par hnRNPA2B1. (**a**) EXO-motifs décrits par (Villarroya-Beltri et al. 2013). (**b**) Proportion des microARN enrichis dans les exosomes neuronaux dont la séquence contient au moins un EXO-motif décrits en (**a**). (**c**) Western blot d'un lysat (10 µg) de neurones corticaux (**NEUR**) et du culot 100 000 g d'exosomes neuronaux (**EXOS**) purifié à partir de de 5.10^6 neurones corticaux (soit 13.10^9 particules estimées).

3. Effet biologique des exosomes neuronaux

3.1. Régulation du volume de l'épine par les exosomes neuronaux

Nous avons testé si les exosomes neuronaux ont un effet sur la physiologie des neurones receveurs. Pour cela, les exosomes sécrétés après stimulation synaptique glutamatergique de 15 min ont été incubés 48 h sur des neurones d'hippocampes matures (15 jours de cultures) transfectés avec un plasmide codant pour la protéine fluorescente mCherry. Après analyse par microscopie confocale, le volume des épines dendritiques a été mesuré à l'aide du logiciel NeuronStudio. L'expérience a été reproduite à partir de 3 cultures primaires de neurones indépendantes (n=3). Nous avons observé une diminution significative du volume de l'épine dendritique mesurée avec les exosomes par rapport à la condition contrôle sans exosomes (**Figure 23**). Ce résultat suggère que les exosomes de neurones régulent négativement le volume de l'épine dendritique.

3.2. Passage du miR-134

Le miR-134 a été décrit dans la régulation du volume de l'épine dendritique en ciblant l'ARNm de la LimK1 (Schratt et al. 2006). Le résultat du séquençage des microARN (voir 2.3) a montré que le miR-134 est abondant ($10^{ème}$) et enrichi dans les exosomes neuronaux. Pour comprendre l'effet observé des exosomes sur le volume de l'épine dendritique (**Figure 23**), nous avons testé le transfert du miR-134 exosomal dans des neurones receveurs.

Pour cela, nous avons utilisé un système rapporteur luciférase de l'activité du miR-134 précédemment décrit (Schratt et al. 2006). Ce système repose sur l'expression de la séquence codant pour la luciférase firefly suivie de la partir 3'UTR de la LimK1 qui contient une séquence cible du miR-134. Ce système rapporteur a été cloné dans un vecteur lentiviral sous un promoteur neuronal spécifique (promoteur de la synapsine 1 (Kügler et al. 2003)) et les lentivirus ont été produits au laboratoire. La luciférase Renilla dont l'ARNm ne possède pas de séquence cible du miR-134 a été transduite en parallèle et utilisée comme contrôle interne.

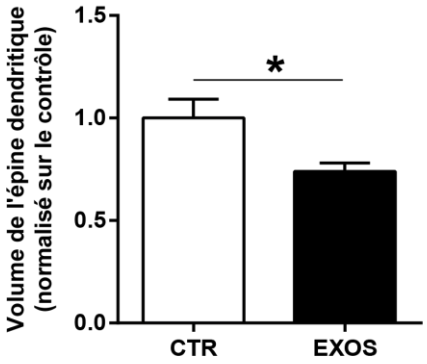


Figure 23 : les exosomes neuronaux diminuent le volume de l'épine dendritique. Les données représentent la moyenne ± SEM du volume de l'épine dendritique de neurones d'hippocampe exprimant la protéine fluorescente mCherry traités sans (**CTR**) ou avec (**EXOS**) des exosomes de neurones corticaux (20.10^9 particules estimées). Le volume de l'épine dendritique a été mesuré après 48 h d'incubation. Analyse statistique : test de Student, * : $p<0,05$, n=14 neurones provenant de 3 cultures de neurones indépendantes.

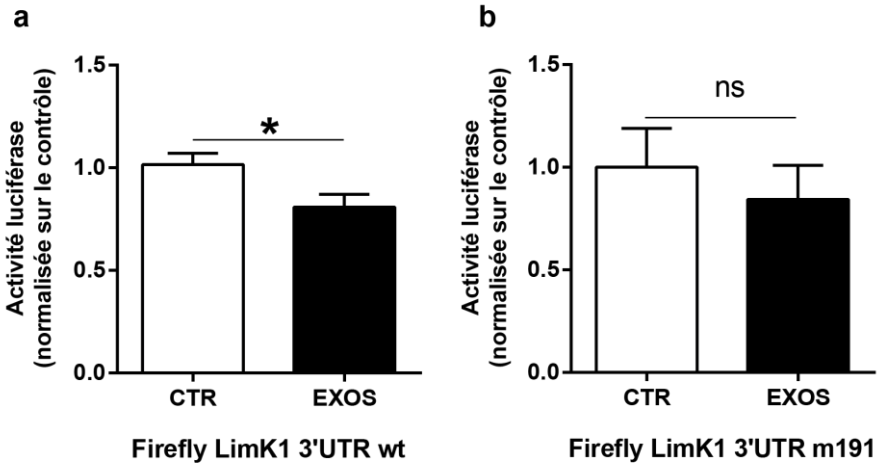


Figure 24 : les exosomes neuronaux diminuent l'activité luciférase de manière indépendante au miR-134. Les données représentent la moyenne ± SEM de l'activité luciférase firefly normalisée sur l'activité luciférase Renilla de neurones d'hippocampe transduits avec le système rapporteur (**a**) firefly LimK1 3'UTR wt ou (**b**) firefly LimK1 3'UTR m191 (muté) traités sans (**CTR**) ou avec (**EXOS**) des exosomes de neurones corticaux (20.10^9 particules estimées). Les activités luciférase firefly ont été mesurées après 48 h d'incubation. Analyse statistique : test de Mann Whitney, * $p < 0,05$, pour (**a**) n=5, pour (**b**) n=3 cultures de neurones indépendantes.

Les exosomes neuronaux sécrétés après stimulation synaptique glutamatergique ont été incubés sur des neurones d'hippocampe transduits avec les lentivirus contenant la séquence codante pour le système rapporteur luciférase. Après 48 h d'incubation l'activité luciférase a été mesurée. Nous avons observé une diminution moyenne statistiquement significative de 20% de l'activité luciférase dans les neurones ayant été incubés avec les exosomes par rapport à la condition sans exosomes (**Figure 24a**).

Pour tester si l'effet des exosomes observé est bien spécifique au miR-134, nous avons réalisé la même expérience avec un système rapporteur luciférase dont la séquence cible du miR-134 a été mutée (m191). Dans le système rapporteur muté, la partie 3'UTR de LimK1 n'est plus la cible du miR-134 (Schratt et al. 2006). Nous avons observé une diminution moyenne de 16% de l'activité luciférase dans les neurones ayant été incubés avec les exosomes par rapport à la condition sans exosomes (**Figure 24b**). Cette diminution de 16%, bien que statistiquement non significative, présente un effet comparable à la diminution de 20% observé avec le rapporteur luciférase sensible au miR-134. Une augmentation du nombre d'expérience permettrait probablement de conclure statistiquement et confirmerait que l'effet des exosomes observé sur l'activité luciférase n'est pas dû au miR-134.

4. Rôle d'Alix dans la biogenèse et la composition des exosomes

Certaines études ont révélé un rôle d'Alix dans la formation des ILV et la sécrétion des exosomes alors que d'autres n'ont noté aucun effet la déplétion d'Alix. Toutes les études réalisées sur le rôle d'Alix dans la biogenèse des exosomes reposent sur l'utilisation d'ARNsi. Le laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années aux différentes fonctions cellulaires d'Alix et a récemment développée une souris ko Alix. Pour mieux comprendre le rôle de la protéine Alix dans la biogenèse et la sécrétion des exosomes, des fibroblastes d'embryons de souris (MEF) on été cultivés à partir des souris ko Alix.

Les travaux de thèse de M. Laporte au laboratoire ont eu pour but de caractériser le phénotype de la souris ko Alix et font l'objet d'un article en cours de publication (M. Laporte et al.). Les souris ko Alix sont viables et fertiles et sont caractérisées par une microcéphalie qui apparaît au cours de l'embryogenèse. Ce phénotype est accompagné d'une apoptose massive des progéniteurs neuronaux lors de la neurogenèse et d'une altération du développement de l'arborisation dendritique post-natal. Les animaux adultes présentent des défauts de plasticité synaptique associés à une altération du recyclage des vésicules synaptiques

Les travaux de thèse de V. Mercier au laboratoire ont eu pour but d'étudier la voie endosomale dans les cellules MEF ko Alix. Dans ces cellules, la structure et l'organisation des endosomes ne sont pas perturbées et l'absence d'Alix ne modifie pas le diamètre moyen des MVE et de leur ILV mais diminue faiblement le nombre de vésicules par MVE (Mercier et al. 2016).

4.1. Alix n'est pas nécessaire à la formation des exosomes mais régule leur taille et leur composition protéique

Tout d'abord, nous avons testé si l'absence d'Alix abolissait la sécrétion des exosomes. Pour cela, nous avons réalisé le protocole de purification des exosomes sur gradient de sucrose à partir du surnageant cellulaire de MEF wt et ko Alix. Dans les deux conditions, l'analyse en Western blot a révélé un signal positif pour les protéines exosomales CD63 et flotilline 1 dans les fractions dont la densité en sucrose est de 1,12 (30% de sucrose) qui correspond à celle des exosomes (**Figure 25a**, **Tableau 1**).

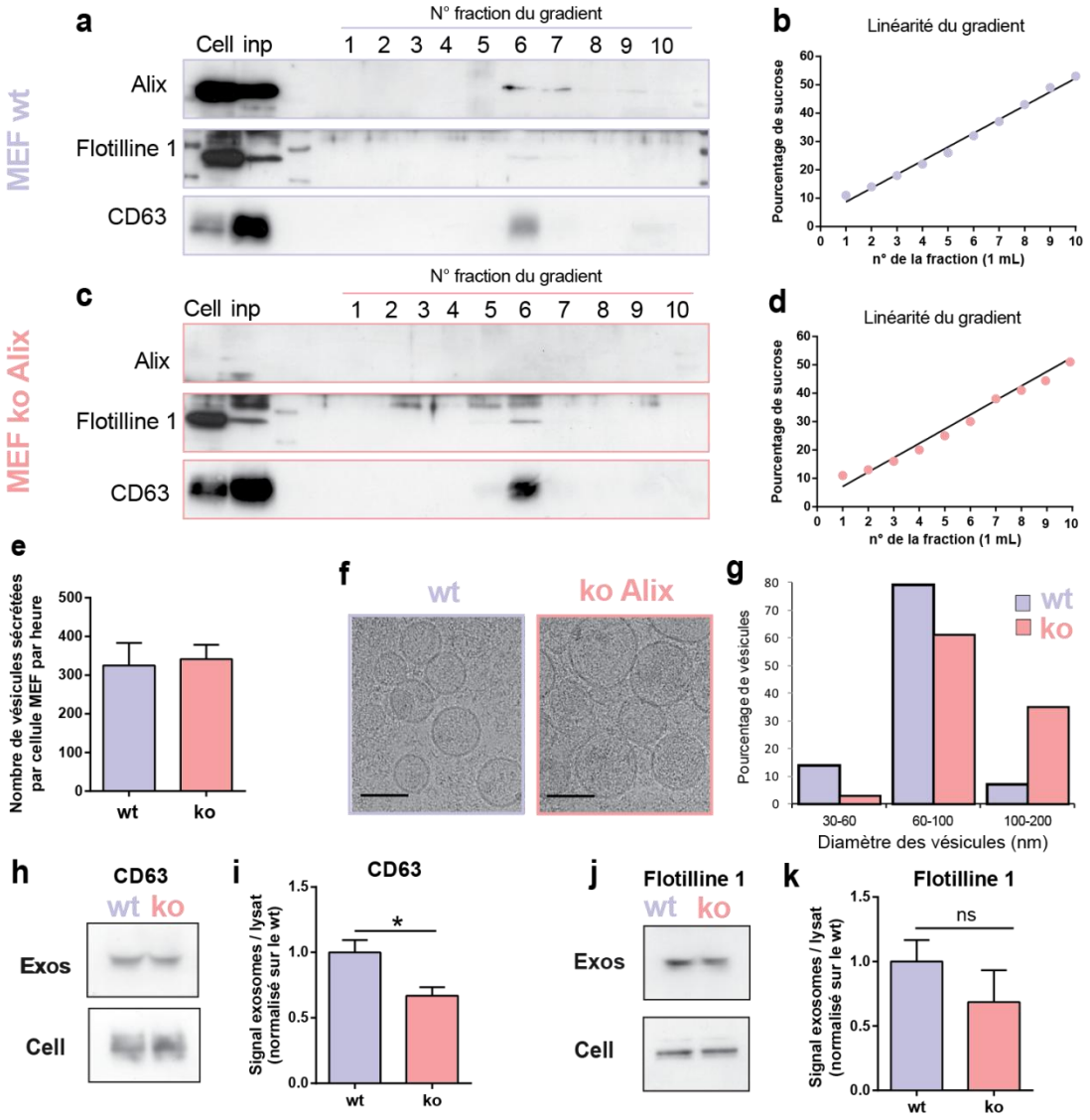


Figure 25 : Alix ne contrôle pas la sécrétion des exosomes de MEF mais régule leur taille et leur composition. (a,c) Western blot du gradient de sucrose des vésicules extracellulaires sécrétées (40.10^9 particules estimées) par des cellules MEF wt **(a)** ou ko Alix **(c)**. Cell : cellule, Inp : échantillon du culot 100 000 x g (5%). **(b,d)** Les graphiques représentent la linéarité des gradients de sucrose pour les échantillons wt **(b)** ou ko Alix **(d)**. **(e)** Les données représentent la moyenne ± SEM du nombre de vésicules sécrétées par une cellule MEF wt ou ko Alix par heure (analyse au NanoSight, n=3). **(f)** Analyse en microscopie cryo-électronique du diamètre des vésicules retrouvées dans le culot 100 000 x g à partir du surnageant de cellules wt et Alix ko. Echelle : 100 nm. **(g)** Quantification de la proportion des vésicules sécrétées par des cellules wt et Alix ko observées en cryo-microscopie électronique en fonction de leur diamètre (le diamètre de au moins 100 vésicules a été mesuré pour chaque génotype). **(i-k)** Les données représentent la moyenne ± SEM respectivement de l'immunoréactivité **(i)** CD63 et **(j)** flotilline 1 des exosomes (20.10^9 particules estimées) normalisée sur celle des cellules. Analyse statistique : test Mann Whitney, * : $p<0.05$, n=6.

Ce résultat montre qu'Alix n'est pas nécessaire pour la sécrétion des exosomes de cellules MEF. L'absence d'Alix ne modifie pas la densité des exosomes puisque les exosomes wt et ko Alix ont été retrouvés dans les fractions de même densité (**Figure 25a**).

Nous avons ensuite cherché si l'absence d'Alix pouvait modifier la quantité des exosomes. C'est pourquoi nous avons effectué une analyse au NanoSight des exosomes purifiée à partir du surnageant de cellules MEF wt et ko Alix après 48 h de culture. Cette technique permet de quantifier la concentration de nanoparticules en solution à partir de l'analyse du suivi de leurs mouvements browniens. Pour améliorer la fiabilité des résultats, chaque mesure a été reproduite 3 fois et ce à partir de 3 purifications d'exosomes indépendantes (n=3). Nous n'avons pas observé de différence significative du nombre de vésicules sécrétées entre les cellules MEF wt et ko Alix. En moyenne une cellule MEF wt sécrète 325 ± 58 microvésicules par heure et une cellule MEF ko Alix en secrète 341 ± 37 (**Figure 25b**).

Pour poursuivre la caractérisation des exosomes de MEF ko Alix, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'absence d'Alix sur le diamètre des exosomes. Les exosomes sécrétés par les cellules MEF wt et ko Alix ont été purifiés et observés en cryo-microscopie électronique (cryo-ME). Cette technique ne requiert ni de fixateur chimique ni de colorant et préserve la morphologie et la structure de l'échantillon. Alors qu'en microscopie électronique classique, les exosomes présentent une morphologie en « *cup shape* », en cryo-ME, leur morphologie sphérique est conservée (**Figure 25c**). Cette technique permet une mesure précise du diamètre des exosomes. L'observation en cryo-ME a été effectuée par notre collaborateur G. Schoehn de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble. L'analyse du diamètre des vésicules des MEF wt et ko Alix a montré que l'absence d'Alix augmente la proportion des vésicules supérieures à 100 nm (**Figure 25c**).

Sachant qu'Alix ne modifie pas la quantité d'exosome sécrétés, nous nous sommes demandé si son absence pouvait modifier les cargos protéiques exportés dans les exosomes. Nous avons analysé par Western blot l'expression des protéines CD63 et flotilline 1 dans les exosomes de cellules MEF wt et ko Alix. Nous avons observé une diminution significative du signal CD63 dans les exosomes ko Alix et une faible diminution non significative du signal flotilline 1. Ces résultats suggèrent que la

déplétion d'Alix a un effet sur la concentration de la tétraspanine CD63 dans les exosomes.

4.2. **Effet de la déplétion d'Alix sur la composition lipidique**

Les membranes endosomales possèdent une composition lipidique typique qui évolue avec la maturation des endosomes. Par exemple, le LBPA est un lipide uniquement retrouvé dans les endosomes tardifs. Des modifications dans la composition lipidique des endosomes perturbent le trafic des membranes requises dans de nombreuses fonctions cellulaires. Plusieurs évidences ont rapporté un lien entre Alix et la composition lipidique des membranes endosomales. Il a notamment été décrit qu'Alix et son partenaire LBPA régule le niveau de cholestérol (Chevallier et al. 2008). C'est pourquoi nous avons réalisé, en collaboration avec le laboratoire de G. Di Paolo de l'Université de Columbia, une analyse lipidomique des cellules MEF wt et ko Alix ainsi que de leurs exosomes respectifs. Pour conclure statistiquement, l'analyse lipidomique a été réalisée à partir de cinq purifications d'exosomes wt et ko Alix indépendantes (n=5).

Les exosomes possèdent une composition lipidique type caractérisée par un enrichissement en sphingomyéline (SM), en céramides (Cer), en cholestérol (Chol), en phosphatidylsérine (PS), en phosphatidylinositol (PI), en acide phosphatidique (PA) et un appauvrissement en phosphatidylcholine (PC) (Wubbolts et al. 2003), (Trajkovic et al. 2008), (Laulagnier, Motta, et al. 2004), (Llorente et al. 2013).

Nous avons tout d'abord comparé la composition lipidique des exosomes avec leur cellule sécrétrice. Les exosomes de cellules MEF wt sont enrichis en cholestérol (Chol), en céramides (Cer), en diacylglycérol (DG), en acide phosphatidique (PA) et appauvris en phosphatidylcholine (PC), phosphatidyl-éthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et LBPA par rapport à leur cellule d'origine. Aucune différence n'a été observée pour la sphingomyéline (SM) (**Figure 26a**) Les exosomes de cellules MEF ko Alix présentent les mêmes abondances relatives que les exosomes de cellules MEF wt à l'exception d'un enrichissement en sphingomyéline (SM) et d'une absence de différence en diacylglycérol (DG) (**Figure 26b**).

Comparé à la composition lipidique d'un exosome type, les exosomes de MEF sont bien enrichis en cholestérol, céramides, PA, SM (pour les ko), et appauvris en PC.

Alors que les exosomes types sont enrichis en PS et PI, ces deux phospholipides sont appauvris dans les exosomes de MEF.

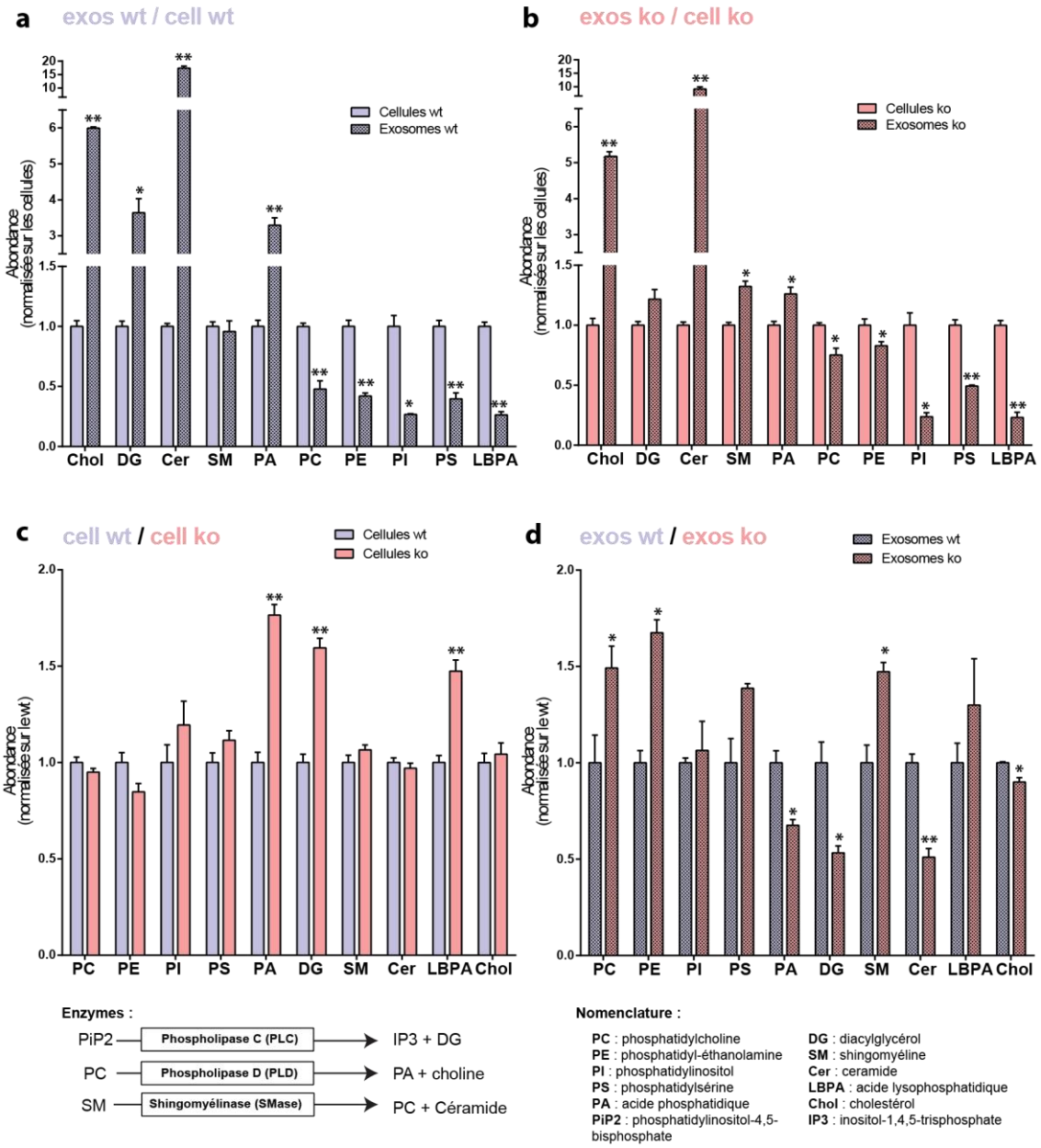


Figure 26 : Alix modifie la composition lipidique des cellules iMEF et de leurs exosomes. **(a, b)** Les données représentent la moyenne ± SEM de l'abondance des lipides dans les exosomes de MEF (**a**) wt et (**b**) ko Alix par rapport à celle de leur cellule d'origine. (**c, d**) Les données représentent la moyenne ± SEM de l'abondance des lipides en absence d'Alix dans (**c**) les cellules MEF et (**d**) leurs exosomes. Analyse statistique : test de Student, * : 0,001<p<0.05, ** : p<0,001, n=6 purifications d'exosomes indépendantes.

Nous avons ensuite analysé l'effet de la déplétion d'Alix sur les cellules et sur les exosomes (**Figure 26c et d**). Dans les cellules, l'absence d'Alix n'a pas d'effet sur la quantité de glycérophospholipides (PC, PE, PI et PS). Il en est de même pour le PI et le PS dans les exosomes. En revanche, les PC et PE sont enrichis dans les exosomes de MEF ko Alix par rapport à ceux des MEF wt.

Les exosomes contiennent des enzymes catalytiquement actives dont la phospholipase D2 (PLD2) (Laulagnier, Grand, et al. 2004). Cette enzyme hydrolyse un PC en PA et choline. L'absence d'Alix conduit à une augmentation du PA dans les cellules et à une diminution dans les exosomes. Comme le PA, le DG est augmenté dans les cellules et appauvri dans les exosomes de MEF ko Alix. Le DG est produit par la phospholipase C (PLC) à partir d'un phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PiP2).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la déplétion d'Alix sur des lipides qui régulent la formation des MVE : les céramides. Ces lipides sont produits par l'hydrolyse de SM par une sphingomélynase (SMase). Dans les cellules, l'absence d'Alix n'a pas d'effet sur la composition en SM et céramides. En revanche, une augmentation de SM et une diminution de céramides ont été observées dans les exosomes de MEF ko Alix.

Le cholestérol est un lipide très enrichi dans la membrane des exosomes par rapport à celle des cellules. Alors que dans la cellule l'absence d'Alix n'a pas d'effet sur l'abondance de cholestérol, une diminution a été observée dans les exosomes de MEF ko Alix. Cette augmentation pourrait avoir des conséquences sur les propriétés physiques de ces exosomes.

Alix interagit avec le LBPA. Il a été montré qu'une baisse de l'expression d'Alix diminuait la quantité de LBPA dans les cellules (Chevallier et al. 2008). L'absence d'Alix conduit à une augmentation du LBPA dans les cellules mais ne modifie pas la quantité de LBPA dans les exosomes. Ce résultat est en apparente contradiction avec les travaux récemment publiés par le laboratoire En effet, une analyse par immunofluorescence de la quantité de LBPA n'avait pas mis en évidence de différence sur la quantité de LBPA dans les cellules MEF ko Alix par rapport aux MEF wt (V. Mercier et al. 2016). Cette différence pourrait s'expliquer par les deux approches expérimentales utilisées, la lipidomique permettant une analyse quantitative plus sensible.

Discussion

L'histoire des exosomes neuronaux a débuté il y a 10 ans dans le laboratoire de Rémy Sadoul par la mise en évidence de la sécrétion des exosomes par les neurones (Fauré et al. 2006). Son équipe a ensuite montré que la sécrétion des exosomes est régulée par l'activité synaptique glutamatergique (Lachenal et al. 2011). L'objectif de mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux par l'étude du rôle des exosomes dans la communication entre les neurones.

1. Les exosomes neuronaux se fixent spécifiquement aux neurones

Nous avons étudié la fixation d'exosomes fluorescents sécrétés par une lignée de neuroblastomes de souris (N2a) ou par des neurones corticaux de rat sur des cellules d'hippocampe de rat. Nous avons montré que les exosomes sécrétés par les N2a après une sécrétion constitutive de 48 h se fixent aux neurones et aux cellules gliales et que les exosomes sécrétés par les neurones après stimulation synaptique glutamatergique de 15 min ne se fixent qu'aux neurones.

1.1. Suivi des exosomes fluorescents

Les exosomes fluorescents de N2a ont été purifiés à partir du surnageant d'une lignée de N2a développée au laboratoire (M. Chivet) qui exprime de façon stable la protéine CD63 fusionnée à la GFP (GFP-CD63). CD63 est une tétraspanine très abondante dans les exosomes ainsi que dans les MVE et les lysosomes des cellules. Comme les tétraspanines possèdent 4 domaines transmembranaires et des extrémités N et C-terminales intracellulaires et que la membrane des exosomes a la même orientation que la membrane plasmique, la GFP se situe à l'intérieur des exosomes GFP-CD63. Cette approche pour obtenir des exosomes fluorescents a déjà été utilisée : une lignée de lymphocytes T (J77T) exprimant stablement CD63 fusionnée à la GFP a été utilisée pour montrer la capture des exosomes de J77T par des lymphocytes B et T (Mittelbrunn et al. 2011). Bien que des exosomes CD63 négatifs sécrétés par une lignée humaine de cancer du sein (MCF-7) aient été observés en microscopie électronique, ces derniers ne représentaient qu'une faible proportion des exosomes de MCF-7 (Deun et al. 2014). C'est pourquoi CD63-GFP est un bon outil pour suivre les exosomes de N2a en microscopie optique à fluorescence.

CD63-GFP n'a pas pu être utilisé pour suivre les exosomes de neurones corticaux du fait du faible taux de transfection des neurones et à ce moment-là la technique de transduction des neurones par lentivirus n'avait pas encore été développée au laboratoire. Les exosomes fluorescents ont été purifiés à partir de neurones incubés avec une protéine recombinante soluble composée de la partie C-terminale de la toxine du tétanos (TTC) fusionnée à une protéine fluorescente (GFP) synthétisée au laboratoire (B. Blot). La toxine du tétanos (TeNT) est une puissante neurotoxine sécrétée par la bactérie anaérobique *Clostridium tetani.* La TTC possède le domaine de fixation de la TeNT mais ne possède ni l'activité endopeptidase, ni le domaine de translocation dans le cytoplasme de la toxine entière (Calvo et al. 2012). L'utilisation de la GFP-TTC est un outil de choix pour marquer les exosomes neuronaux grâce à sa spécificité neuronale. Néanmoins, comme cette protéine est située à l'extérieur des exosomes nous avons pris la précaution de purifier systématiquement les exosomes sur gradient de sucrose. L'observation en microscopie électronique des exosomes GFP-TTC et de leur fixation sur les neurones a été nécessaire pour contrôler que la GFP-TTC observée en microscopie optique à fluorescence était bien associée aux exosomes neuronaux.

De nombreuses études sur le suivi de la fixation des exosomes utilisent des molécules fluorescentes qui s'incorporent dans la bicouche lipidique Le PKH67 (Sigma-Aldrich) est l'une de ces molécules les plus utilisées. Nous souhaitions utiliser le PKH67 pour marquer les exosomes neuronaux. La spécificité du marquage a été contrôlée en réalisant en parallèle le même protocole du marquage des exosomes sans exosomes. Après purification sur gradient de sucrose et incubation sur des neurones, une fluorescence a été observée dans la condition contrôle sans exosomes. Ce risque avéré de contamination au PKH67 ne nous aurait pas permis de conclure que le marquage fluorescent observé soit dû aux exosomes. Dans nos conditions expérimentales, le PKH67 n'est pas un bon outil pour marquer les exosomes.

1.2. **Spécificité de fixation des exosomes neuronaux**

La TeNT possède une forte affinité de fixation sur les neurones via les gangliosides (Chen et al. 2009). En 2014, il a été montré que la présence d'une protéine de la matrice extracellulaire, le nidogen (ou entactine) est un élément déterminant pour la fixation de la TeNT au niveau de la jonction neuromusculaire (Bercsenyi et al. 2014). Dans notre étude, l'absence de compétition entre la TTC soluble non GFP et les

exosomes GFP-TTC nous a montré que la spécificité de fixation des exosomes GFP-TTC n'est pas médiée par la GFP-TTC. Il serait intéressant de réaliser une expérience de compétition entre les exosomes GFP-TTC et le peptide dérivé du nidogen décrit par Bercsenyi et collaborateurs pour confirmer que la TTC n'est pas responsable de la fixation spécifique des exosomes neuronaux.

Certaines molécules ont déjà été impliquées dans la fixation des exosomes. Par exemple, il a été montré que la fixation des exosomes sur des cellules dendritiques est médiée par la phosphatidylsérine (PS), la lactadhérine (ou MGF-E8), CD11a, CD54 et les tétraspanines CD9 et CD81 présentes sur la surface des exosomes et par CD11, CD54, les intégrines α5/β3, présentes sur la membrane des cellules dendritiques (Morelli et al. 2004). La fixation des exosomes sur leur cellule cible peut être médiée par des molécules d'adhésion cellule-cellule classique. C'est pourquoi, il est possible que la fixation spécifique des exosomes neuronaux sur les neurones soit médiée par des molécules d'adhésion neurones spécifiques.

Nous avons observé une fixation spécifique des exosomes neuronaux sur les neurones puisqu'ils ne se fixent pas sur les cellules gliales. Ce résultat est en contradiction apparente avec ceux de Morel et collaborateurs (2013) puisque ces derniers ont montré un effet des exosomes neuronaux sur les astrocytes. En effet, des exosomes purifiés à partir de cultures primaires de neurones en développement après une sécrétion constitutive de 5 à 8 jours de culture, incubés sur des cultures primaires d'astrocytes augmentent l'expression du récepteur au glutamate GLT1 dans les astrocytes. Les auteurs ont également montré que cet effet des exosomes est médié par le transfert du miR-124 des exosomes neuronaux aux astrocytes (Morel et al. 2013). Dans nos expériences, les exosomes neuronaux ont été purifiés après une stimulation synaptique glutamatergique de 15 min à partir de cultures primaires de neurones matures. Il serait intéressant de tester si la spécificité de fixation des exosomes neuronaux est une propriété des exosomes sécrétés par des neurones matures et/ou caractéristique des exosomes dont la sécrétion a été stimulée par l'activité synaptique glutamatergique.

1.3. **Propagation de la TeNT via les exosomes**

L'utilisation de la TTC pour suivre les exosomes neuronaux suggère le transport de la TeNT via les exosomes. Suite à l'infection d'une plaie par *Clostridium tetani*, la toxine tétanique se fixe aux motoneurones où elle est endocytée et transportée de manière rétrograde. Un mécanisme moléculaire incompris permet le passage de la TeNT du motoneurone dans l'interneurone où elle rencontre son substrat VAMP2. Le clivage de VAMP2 par la TeNT bloque la libération des neurotransmetteurs inhibiteurs et provoque une hyperexcitabilité des motoneurones responsable de la contraction musculaire tétanique.

L'association de la TTC aux exosomes soulève l'hypothèse que la TeNT soit transportée du motoneurone à l'interneurone via les exosomes. La première étape pour tester cette hypothèse serait de confirmer que la toxine du tétanos entière est associée aux exosomes neuronaux suite à leur purification sur gradient de sucrose ou en microscopie électronique. Puis il faudrait tester si des exosomes transportant la toxine provoquent un clivage de VAMP2 dans des neurones receveurs. Nos résultats préliminaires ont montré la présence des deux sous-unités de la TeNT dans le culot 100 000 x g d'exosomes de neurones incubés avec la toxine tétanique mais une purification sur gradient de sucrose est nécessaire pour conclure sur l'association de la TeNT aux exosomes.

2. Le miRNome des neurones et de leurs exosomes

Nous nous sommes intéressés à la composition en ARN des exosomes sécrétés par des neurones après stimulation des synapses glutamatergiques. Un séquençage à haut débit des microARN contenus dans les neurones sans stimulation et après stimulation et dans les exosomes sécrétés par les neurones stimulés a été réalisé en collaboration avec le laboratoire d'A. Buck de l'Université d'Edimbourg.

2.1. **Effet de la stimulation synaptique sur les microARN**

En 2010, Krol et collaborateurs ont mis en évidence que l'activité synaptique régule le taux de microARN matures suivants : miR-124, miR-128, miR-134 et miR-138 (Krol et al. 2010). Comme le mécanisme d'élimination de ces microARN est inconnu, nous voulions tester l'hypothèse selon laquelle ces microARN étaient exportés dans les exosomes.

Nos résultats ont montré qu'une stimulation de l'activité synaptique glutamatergique de 15 min ne modifie pas la composition des neurones en microARN. Cette observation est en contradiction apparente avec les résultats de Krol et collaborateurs. Cependant, des variations dans les protocoles expérimentaux pourraient expliquer cette différence. La technique et la durée de stimulation diffèrent entre nos deux protocoles : Krol et ses collaborateurs ont stimulé les neurones par du glutamate qui active les récepteurs synaptiques et extra-synaptiques alors que nous avons utilisé de la bicuculline qui active indirectement les récepteurs glutamatergiques synaptiques. De plus, nous avons effectué une stimulation rapide de 15 min alors que Krol et collaborateurs ont effectué une stimulation de 3 et 6 h. Enfin, contrairement aux auteurs, nous n'avons pas utilisé d'inhibiteur de la transcription. Il serait intéressant de tester si ces paramètres peuvent expliquer nos résultats.

2.2. **Composition en microARN des exosomes**

Les résultats du séquençage nous ont fourni la liste complète des microARN contenus dans les exosomes ainsi que leur abondance. Il faut distinguer la notion d'abondance dans les exosomes avec celle d'enrichissement. L'abondance fait référence à la quantité de microARN présents dans les exosomes indépendamment des neurones. La notion d'enrichissement fait référence à la quantité de microARN présents dans les exosomes par rapport à celle retrouvée dans les neurones. Par exemple, un microARN peut être très abondant dans les exosomes mais pas enrichi si celui-ci est aussi abondant dans les neurones.

2.3. **Les microARN les plus abondants dans les exosomes**

Deux microARN sont très abondants dans les exosomes de neurones : le miR-129-5p et le miR-22-5p.

Parmi eux, le plus abondant est le miR-129-5p. Bien qu'il soit également abondant dans les neurones, le miR-129-5p est enrichi dans les exosomes où il est 11 fois plus abondant que dans les neurones. Le miR-129 a été décrit comme enrichi dans les neurones par rapport aux cellules gliales (Jovičić et al. 2013). Cette observation suggère que le miR-129-5p est important dans la physiologie des neurones. Cependant, ce microARN a surtout été étudié dans un contexte tumoral puisque la diminution de son expression a été observée dans plusieurs types de cancer. De plus, il a été montré

que la diminution de l'expression du miR-129 stimule la prolifération cellulaire et augmente l'expression de plusieurs protéines clés dans la régulation du cycle cellulaire : Bcl2, la thymidylate synthase, SOX4, CDK6 et E2F3 (Fesler et al. 2014). Le miR-129 est très étudié pour son potentiel thérapeutique dû à son rôle de suppresseur de tumeur.

Le second microARN le plus abondant dans les exosomes neuronaux, en quantité similaire au miR-129-5p, est le miR-22-5p. En 2013, Jovicic et collaborateurs ont mis en évidence sur des cultures primaires de neurones corticaux et du striatum un effet neuroprotecteur du miR-22 (Jovicic et al. 2013). Dans leur étude, différents modèles de mort neuronale ont été utilisés tels que le vieillissement des cultures, la toxicité à l'acide 3-nitropropionique (inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale) et des mutants de la protéine huntingtine responsables de la maladie de Hungtinton. Dans tous les cas, la surexpression du miR-22 conduit à une diminution significative de la perte de neurones et à une diminution de l'apoptose (Jovicic et al. 2013) . Basé sur ces résultats, il serait intéressant de tester si les exosomes neuronaux, sécrétés après stimulation synaptique glutamatergique, ont un effet neuroprotecteur sur des neurones d'hippocampe.

Parmi les 15 microARN les plus abondants dans les exosomes, les microARN miR-9a miR-128-3p, miR-134-5p, miR-125b et le miR-124 ont été impliqués dans la régulation de la croissance neuronale ou la plasticité (Olde Loohuis et al. 2012).

2.4. **Les microARN sont sélectivement exportés dans les exosomes**

L'analyse comparative entre les microARN contenus dans les neurones stimulés et leurs exosomes a révélé que 154 microARN ont un taux d'expression significativement différent entre les neurones stimulés et leurs exosomes : 49 microARN sont enrichis dans les exosomes et 105 microARN sont appauvris dans les exosomes. Nos résultats montrent que les microARN sont sélectivement exportés dans les exosomes de neurones sécrétés après une brève stimulation synaptique glutamatergique.

Le microARN le plus enrichi dans les exosomes est le miR-122-5p. La quantité de ce microARN est 300 fois plus grande dans les exosomes que dans les neurones. Il serait intéressant de comprendre l'effet de ce microARN dans les neurones. Ce dernier a principalement été étudié dans le foie où il a été décrit comme régulant positivement la

réplication du virus de l'hépatite C et négativement la réplication du virus de l'hépatite B (Song et al. 2015).

Nos résultats montrent également que seul les ARN courts (<200 nt) sont exportés dans les exosomes. Bien que nous nous sommes concentrés sur les microARN, il serait intéressant de regarder la présence d'autres ARN dans les exosomes neuronaux. En effet, il a été montré que parmi les ARN courts, les microARN ne sont pas les plus abondants dans les exosomes (Nolte-'t Hoen et al. 2012). Il a aussi été démontré que les exosomes contiennent des ARNm fragmentés qui pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes dans la cellule receveuse d'exosome (Batagov & Kurochkin 2013).

2.5. **Mécanisme du contrôle de l'export des microARN**

Nos résultats ont montré que la composition en microARN des exosomes neuronaux n'est pas le reflet de celle des neurones, certains microARN sont enrichis et d'autres appauvris dans les exosomes. Il est très probable qu'il existe un mécanisme de tri pour l'export des microARN dans les exosomes de neurones. Un mécanisme du contrôle des microARN exportés dans les exosomes de lymphocytes T a été mis en évidence en 2013 (Villarroya-Beltri et al. 2013). Nous avons testé si ce mécanisme est retrouvé dans les neurones. Bien que l'analyse des séquences des microARN enrichis dans les exosomes a montré que 92% d'entre eux possèdent au moins un des EXO-motifs décrits par Villarroya-Beltri, la protéine hnRNPA2B1 n'a pas été retrouvée dans les exosomes neuronaux. Le mécanisme du contrôle des microARN exportés dans les exosomes neuronaux n'est pas médié par hnRNPA2B1.

Il a été montré que les hnRNPA1 et hnRNPC peuvent également se fixer sur des microARN exosomaux (Villarroya-Beltri et al. 2013). Il serait intéressant de tester si ces hnRNP sont retrouvées dans les exosomes neuronaux.

2.6. **Effet des exosomes neuronaux**

Les épines dendritiques constituent le compartiment post-synaptique receveur de l'influx nerveux des synapses excitatrices glutamatergiques et possèdent leur propre composition moléculaire et une organisation structurale très dynamique. Leur morphologie est corrélée avec l'efficacité de la transmission synaptique et est régulée par le cytosquelette d'actine.

Nous avons cherché si les exosomes neuronaux modifié la physiologie du neurone receveur. Nous avons montré que l'incubation des exosomes neuronaux sur des neurones d'hippocampe diminue le volume moyen de leurs épines dendritiques. Cette observation pourrait être expliquée par le transfert de microARN dans les neurones via les exosomes. Un effet de microARN exosomal sur les neurones a déjà été observé : il a été montré que le miR-133b contenu dans les exosomes de cellules souches mésenchymateuses contribue à la croissante des neurites (Xin et al. 2012).

Plusieurs microARN régulent négativement le volume de l'épine et ont été retrouvés dans les exosomes neuronaux : le miR-134 (Schratt et al. 2006), les miR-29a/b (Lippi et al. 2011) et le miR-138 (Siegel et al. 2009). Parmi eux, le miR-134 est le plus abondant et est enrichi dans les exosomes par rapport aux cellules.

Parmi les microARN retrouvés dans les exosomes de neurones corticaux, les miR-92a, miR-124 et miR-181 régulent l'expression des récepteurs AMPA. L'activation de ces récepteurs au glutamate exprimés au niveau des épines dendritiques des synapses excitatrices, provoque une entrée de sodium induisant une dépolarisation membranaire responsable de la transmission de l'influx nerveux. Une diminution des récepteurs AMPA provoque une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique. La régulation de l'expression des récepteurs AMPA par les microARN contenus dans les exosomes pourrait donc avoir un impact sur l'efficacité de la transmission synaptique. Cette hypothèse est renforcée par notre résultat qui montre que les exosomes diminuent le volume de l'épine dendritique. Il serait donc intéressant de tester si l'incubation d'exosomes neuronaux conduit à une diminution de l'expression des sous unités des récepteurs AMPA dans les neurones receveurs. L'effet des exosomes neuronaux sur l'efficacité de la transmission synaptique pourrait ensuite être observé par une approche en électrophysiologie.

Il n'a pas été possible de comparer la composition en microARN entre des exosomes sécrétés après stimulation synaptique glutamatergique et des exosomes sécrétés par les neurones non stimulés. Sans stimulation de la sécrétion des exosomes par l'activité synaptique nous ne disposions pas d'assez de matériel pour réaliser un séquençage. Cette comparaison aurait été très intéressante puisqu'un lien entre l'activité neuronale et la composition en microARN des exosomes neuronaux a déjà été observé. En effet, il a été montré que le taux du miR-124 augmente dans les exosomes neuronaux

après une dépolarisation membranaire ou après un traitement à la tétrodotoxine (Morel et al. 2013). Cette toxine inhibe les canaux sodiques voltage-dépendants et bloque ainsi l'activité neuronale. La sécrétion des exosomes neuronaux est stimulée par une dépolarisation membranaire (Lachenal et al, 2011) et est inhibée par un traitement à la tétrodotoxine (donnée du laboratoire non publiée). Les auteurs ont analysé le taux de miR-124 mais n'ont pas testé si les traitements modifiaient la quantité d'exosomes sécrétés. Pour conclure sur l'enrichissement du miR-124 dans les exosomes, il faudrait discriminer une augmentation d'exosomes contenant la même quantité de miR-124 par exosome avec une augmentation du chargement de miR-124 par exosome.

2.7. **Système rapporteur**

Nous voulions tester si l'effet des exosomes sur la diminution du volume de l'épine pouvait être expliquée par le transfert d'un microARN. L'effet d'un microARN peut être observé à l'aide de système rapporteur basé sur l'expression d'une protéine rapporteur dont la séquence codante est suivie par une séquence 3'UTR comportant une région cible du microARN d'intérêt.

Initialement, nous voulions utiliser un système rapporteur fluorescent. Celui-ci était basé sur l'expression d'un ARNm codant pour la protéine fluorescente mCherry dont la séquence 3'UTR était la cible du miR-138 (système *on→off*). Ce système rapporteur a été utilisé pour mettre en évidence l'effet du miR-138 dans les neurones d'hippocampe (Siegel et al. 2009) et nous a été fourni par le laboratoire G. Schratt. Nous avons testé ce système mais le taux d'expression de la mCherry et de la GFP (utilisée comme contrôle de transfection) était trop variable pour être utilisé dans le cadre des exosomes. Il était donc impossible de conclure entre une faible expression de la protéine et la diminution de son expression.

Nous avons donc décidé de changer de système rapporteur pour utiliser un système inverse dont le rapporteur s'exprime en présence du microARN (système *off→on*). Ce système, plus sensible, est basé sur l'expression du répresseur de la transcription de GAL4 codé par un ARNm qui est la cible du microARN étudié. En présence du microARN, le répresseur (GAL4) n'était plus exprimé et la protéine fluorescente devait s'exprimer. Ce système (*off→on*) a été développé et fourni par le laboratoire de K. Haynes (Haynes et al. 2012). Des fuites dans l'expression des

protéines fluorescentes ne nous ont pas permis d'utiliser de manière fiable ce système dans le cadre des exosomes.

Afin de permettre une approche plus sensible et quantitative nous avons finalement choisi d'utiliser un système rapporteur luciférase, rendu possible par le développement au laboratoire de la technique de transduction des neurones par des lentivirus. Dans ce système rapporteur, la séquence codante de la luciférase est suivie de la séquence 3'UTR de la LimK1 décrite comme une cible du miR-134 (Schratt 2006). Nous avons observé que les exosomes provoquaient une diminution de l'activité luciférase dans les neurones mais de manière non spécifique au miR-134. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que la séquence 3'UTR de la LimK1 est la cible d'autres microARN contenus dans les exosomes de neurones corticaux comme par exemple le miR-20a-5p (Zhou et al. 2014). Il faudrait donc développer une approche globale et reproduire l'expérience en utilisant plusieurs combinaisons de séquence 3'UTR mutées afin qu'elles ne soient plus la cible des différents microARN retrouvés dans les exosomes.

3. Rôle d'Alix dans la biogenèse et la composition des exosomes

Afin de mieux comprendre la fonction de la protéine Alix dans la biogenèse et la composition des exosomes, nous avons caractérisé les exosomes purifiés à partir de cellules MEF sauvages (wt) et déplétées pour la protéine Alix (ko Alix) (Mercier et al. 2016).

3.1. Alix n'est pas nécessaire pour la sécrétion des exosomes

Nous avons observé qu'Alix n'est pas nécessaire pour la sécrétion des exosomes de cellules MEF mais surtout que son absence n'a pas d'effet sur la quantité de vésicules sécrétées. Ce résultat montre qu'Alix n'est pas impliqué dans la biogenèse des exosomes, en accord avec les travaux de Trajkovic et collaborateurs qui ont montré que la formation des exosomes de cellules Oli-neu est indépendante d'Alix (Trajkovic et al. 2008). De manière surprenante, Baietti et collaborateurs ont mis en évidence dans des cellules MCF-7 le rôle d'Alix sur la formation des exosomes via le complexe syndécane-synténine (Baietti et al. 2012). Dans leurs expériences, une diminution de l'expression d'Alix conduit à une diminution de la sécrétion des exosomes contenant les protéines syndécane, synténine, Alix, CD63 et HSP70. Or, la technique expérimentale

utilisée dans leur étude ne permet pas de discriminer entre une diminution du nombre d'exosomes sécrétés et une diminution de la quantité de protéines exportées par exosome. Il est possible que l'absence d'Alix conduise à une diminution de l'export des protéines sans perturber la quantité de vésicules sécrétées. Cette hypothèse est renforcée par notre résultat qui montre une diminution significative du signal CD63 dans les exosomes de MEF ko Alix, résultat qui a également été observé dans des cellules HeLa (Colombo et al. 2013). Alix aurait donc un rôle dans le chargement des molécules à exporter dans les ILV, futurs exosomes. Pour tester cette hypothèse, nos résultats doivent être compléter par l'analyse spécifiques d'autres marqueurs protéiques ou par une approche protéomique entre les exosomes de MEF wt et ko Alix. De plus, il est important de noter que nos études ont été réalisées à partir de culot 100 000 x g et doivent être reproduites en utilisant des exosomes purifiés à partir d'un gradient de sucrose ou par immunoprécipitation. Cette remarque est appuyée par les travaux récents sur la caractérisation protéiques des différents types de vésicules extracellulaires démontrant que contrairement à CD63, la protéine flotilline est présente dans toutes les vésicules extracellulaires (Kowal et al. 2016).

3.2. **Effet de la déplétion d'Alix sur la composition lipidique**

L'analyse lipidomique comparative entre les exosomes de cellules MEF wt et ko Alix a mis en évidence un effet d'Alix sur la composition lipidique des exosomes.

Nous avons observé une diminution du diacylglycérol (DG) et de l'acide phosphatidique (PA) dans les exosomes ko Alix. Ces derniers sont respectivement produits par les phospholipases C et D. La diminution du DG et du PA dans les exosomes peut être la conséquence d'une diminution des enzymes dans les exosomes et/ou d'un défaut dans l'export de ces lipides dans les exosomes. Il a été montré que la phospholipase D2 (PLD2) est présente dans les exosomes mais surtout que son activité est corrélée avec la quantité d'exosomes sécrétés (Laulagnier, Grand, et al. 2004). Comme Alix ne modifie pas la quantité d'exosomes sécrétés, on peut alors penser que la diminution de DG et de PA dans les exosomes ko Alix est due à une diminution de l'export de ces lipides lors de la formation des ILV des MVE, futurs exosomes.

Nous avons également observé une augmentation de la sphingomyéline (SM) et une diminution de céramides dans les exosomes de MEF ko Alix. Les céramides sont issus de l'hydrolyse de la SM par une sphingomyélinase (SMase). Il a été montré que la

sécrétion des exosomes est régulée par les céramides puisque l'inhibition de le SMase diminue la sécrétion des exosomes (Trajkovic et al. 2008). L'augmentation de la SM et la diminution des céramides suggèrent une diminution de la SMase. Par conséquent, une diminution de la quantité d'exosomes devrait être observée. Or, là encore, il est important de noter que Trajkovic et collaborateurs ont utilisé une technique qui ne permet pas de discriminer entre une diminution du nombre d'exosomes sécrétés et une diminution des protéines sécrétées par exosome. Ainsi, il est possible que les céramides participent au contrôle des molécules exportées dans les exosomes.

Le cholestérol est un composant très abondant dans la membrane des exosomes. Nos résultats montrent que la déplétion d'Alix provoque une diminution de 13% du cholestérol dans les exosomes. Ce lipide a tendance à rigidifier les membranes. Il serait important de comparer l'effet de la déplétion d'Alix sur la rigidité membranaire (Laulagnier, Grand, et al. 2004). Une diminution de la rigidité membranaire des exosomes ko Alix pourrait avoir des conséquences importantes sur leur stabilité dans les fluides corporels. La déplétion d'Alix pourrait compromettre la communication exosomale à travers l'organisme.

3.3. **Conclusion sur Alix**

En conclusion, l'absence d'Alix n'a pas d'effet majeur sur les exosomes. Cependant, il est possible que la déplétion d'Alix soit subtile en affectant par exemple une sous population d'exosomes. En effet, plusieurs populations d'exosomes pourraient coexister ainsi que plusieurs populations de MVE (White et al. 2006). Certains MVE peuvent fusionner à la membrane plasmique conduisant à la sécrétion des exosomes alors que d'autres fusionnent avec les lysosomes. Les mécanismes qui contrôlent la destination des MVE ne sont pas encore compris. Néanmoins, le cholestérol semblerait être un élément déterminant puisque les MVE riches en cholestérol fusionnent avec la membrane plasmique (sécrétion des exosomes) alors que les MVE pauvres en cholestérol sont ciblés aux lysosomes (Möbius et al. 2002). Ces observations sont d'autant plus intéressantes que nous avons observé une diminution du cholestérol dans les exosomes ko Alix. La déplétion d'Alix semblerait modifier la composition lipidique et protéique des exosomes. Sachant que l'absence de la protéine Alix conduit à une diminution drastique des microARN exportés dans les exosomes (Iavello et al. 2016), le contenu en microARN des exosomes ko Alix devrait être différent de celui des

exosomes wt. Néanmoins, des analyses en qPCR n'ont pas mis en évidence d'effet de la déplétion d'Alix sur l'expression des miR-138 et miR-146 dans les exosomes de cellules MEF (données du laboratoire non publiées, travaux de S. Fraboulet). Une approche sur un plus grand nombre de microARN (dont ceux décrits par Iavello et collaborateurs) permettrait de conclure sur l'export des microARN dans les exosomes de MEF ko Alix.

Il a été montré qu'en absence d'Alix, les endosomes précoces et de recyclage étaient relocalisés de la périphérie membranaire vers la région périnucléaire (Cabezas et al. 2005). Dans les cellules ko Alix, la structure et l'organisation des endosomes ne sont pas perturbées et l'absence d'Alix ne modifie pas le diamètre moyen des MVE et de leur ILV mais diminue le nombre de vésicule par MVE (V. Mercier et al. 2016). En revanche, il serait intéressant de tester l'effet de la déplétion d'Alix sur la cortactine dans les cellules MEF ko Alix. La cortactine est une protéine régulatrice du cytosquelette d'actine. Il a été montré que l'absence d'Alix conduit à une accumulation de structure riche en cortactine (Cabezas et al. 2005) mais surtout que la cortactine régule la sécrétion des exosomes (Sinha et al. 2016). En effet, une diminution et une surexpression de cette protéine induisent respectivement une diminution et une augmentation de la sécrétion des exosomes (TSG101, EGFR, Flotilline et CD63 positifs). Les auteurs ont montré que la cortactine contrôle le trafic des endosomes tardifs et l'arrimage des MVE de manière coordonnée avec Rab27a et coronine 1b (Sinha et al. 2016).

En conclusion, l'utilisation de cellules ko Alix est un outil de choix pour l'étude du rôle d'Alix dans la sécrétion et la biogenèse des exosomes. Cependant, nos résultats sur la caractérisation des exosomes ko Alix et de leur contenu protéique doivent nécessairement être approfondis et renforcés.

4. Conclusion

L'objectif principal de mon travail de thèse était d'étudier si les exosomes permettent la communication entre les neurones. Nous avons franchi une première étape en démontrant que les exosomes neuronaux se fixent spécifiquement aux neurones. Cette étape nous a permis de confirmer notre hypothèse du passage des exosomes entre les neurones. De plus, puisque les exosomes sécrétés par les neurones se fixent aux neurones mais pas aux cellules gliales, il est raisonnable de penser que les exosomes neuronaux véhiculent de l'information uniquement destinée aux neurones. Cet élément renforce notre hypothèse du rôle des exosomes dans la communication entre les neurones.

Nous avons observé que l'incubation des exosomes neuronaux provoque une diminution du volume de l'épine dendritique. La morphologie des épines dendritiques est corrélée avec l'efficacité de la transmission synaptique. Une diminution du volume de l'épine dendritique conduit généralement à la diminution de l'efficacité de la transmission synaptique. Nos futures expériences d'électrophysiologie nous permettront de confirmer si l'incubation des exosomes neuronaux diminue l'efficacité de la transmission synaptique. Si tel est le cas, alors nous montrerions que les exosomes neuronaux participent à la plasticité synaptique.

Les microARN sont de puissants régulateurs de l'expression génique et sont aujourd'hui des éléments clés dans la régulation de la plasticité synaptique. Nous connaissons désormais la composition des exosomes en microARN. Parmi eux se trouve des microARN impliqués dans la plasticité synaptique. Les exosomes neuronaux pourraient moduler l'efficacité de la transmission synaptique dans des neurones receveurs par l'intermédiaire des microARN.

La sécrétion des exosomes neuronaux est régulée par l'activité synaptique glutamatergique. La stimulation des synapses excitatrices provoque une libération massive d'exosomes qui, si notre hypothèse est confirmée, diminurait l'efficacité de la transmission synaptique dans des neurones receveurs. De cette manière, les exosomes neuronaux pourraient réguler les connections synaptiques pour maintenir un équilibre dans les réseaux neuronaux et participeraient donc à l'homéostasie synaptique.

Références

Aksoy-Aksel, A., Zampa, F. & Schratt, G., 2014. MicroRNAs and synaptic plasticity--a mutual relationship. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1652).

Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M., 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in immunology*, 5, p.442.

Babst, M., 2011. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current opinion in cell biology*, 23(4), pp.452–7.

Bahrini, I. et al., 2015. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Scientific Reports*, 5, p.7989.

Baietti, M.F. et al., 2012. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14.

Banerjee, S. et al., 2009. A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron*, 64(6), pp.871–84.

Von Bartheld, C.S. & Altick, A.L., 2011. Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Progress in neurobiology*, 93(3), pp.313–40.

Batagov, A.O. & Kurochkin, I. V, 2013. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology direct*, 8, p.12.

Bercsenyi, K. et al., 2014. Tetanus toxin entry. Nidogens are therapeutic targets for the prevention of tetanus. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), pp.1118–23.

Bicker, S. et al., 2013. The DEAH-box helicase DHX36 mediates dendritic localization of the neuronal precursor-microRNA-134. *Genes & development*, 27(9), pp.991–6.

Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), pp.911–7.

Blum, D. et al., 2004. Increased Alix (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X) immunoreactivity in the degenerating striatum of rats chronically treated by 3-nitropropionic acid. *Neuroscience letters*, 368(3), pp.309–13.

Briz, V. & Baudry, M., 2016. Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*.

Cabezas, A. et al., 2005. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *Journal of cell science*, 118(Pt 12), pp.2625–35.

Calvo, A.C. et al., 2012. Fragment C of tetanus toxin: New insights into its neuronal

signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*.

Chan, R.B. et al., 2012. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 287(4), pp.2678–88.

Chen, C. et al., 2009. Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin. *The Journal of biological chemistry*, 284(39), pp.26569–77.

Chevallier, J. et al., 2008. Lysobisphosphatidic Acid Controls Endosomal Cholesterol Levels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), pp.27871–27880.

Chiasserini, D. et al., 2014. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: A comprehensive dataset. *Journal of Proteomics*, 106, pp.191–204.

Chivet, M. et al., 2012. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Frontiers in physiology*, 3, p.145.

Colombo, M. et al., 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*, 126(Pt 24), pp.5553–65.

Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C., 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 30, pp.255–89.

Denzer, K. et al., 2000. Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *The Journal of Immunology*, 165(3), pp.1259–1265.

Deun, J. Van et al., 2014. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(0).

Dores, M.R. et al., 2012. ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *The Journal of cell biology*, 197(3), pp.407–19.

Eacker, S.M., Dawson, T.M. & Dawson, V.L., 2013a. The interplay of microRNA and neuronal activity in health and disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, p.136.

Eacker, S.M., Dawson, T.M. & Dawson, V.L., 2013b. The interplay of microRNA and neuronal activity in health and disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, p.136.

Edbauer, D. et al., 2010. Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), pp.373–384.

Edgar, J.R., Eden, E.R. & Futter, C.E., 2014. Hrs- and CD63-Dependent Competing

Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic*, 15(2), pp.197–211.

Fabian, M.R. & Sonenberg, N., 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), pp.586–593.

Fader, C.M. et al., 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(12), pp.1901–1916.

Fauré, J. et al., 2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences*, 31(4), pp.642–8.

Fesler, A., Zhai, H. & Ju, J., 2014. miR-129 as a novel therapeutic target and biomarker in gastrointestinal cancer. *OncoTargets and Therapy*, 7, pp.1481–1485.

Fiore, R. et al., 2009. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *The EMBO journal*, 28(6), pp.697–710.

Fiore, R. et al., 2014. MiR-134-dependent regulation of Pumilio-2 is necessary for homeostatic synaptic depression. *The EMBO journal*, 33(19), pp.2231–46.

Fröhlich, D. et al., 2014. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons : impact on neuronal firing rate , signal transduction and gene regulation Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons : impact on neuronal firing rate , signal transduction and. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369, p.20130510.

Frühbeis, C. et al., 2013. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS biology*, 11(7), p.e1001604.

Gao, J. et al., 2010. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*, 466(7310), pp.1105–1109.

Gibbings, D. et al., 2012. Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nature structural & molecular biology*, 19(5), pp.517–24, S1.

Gibbings, D.J. et al., 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology*, 11(9), pp.1143–9.

Goldie, B.J. et al., 2014. Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic acids research*, 42(14),

pp.9195–208.

Goncalves, M.B. et al., 2015. Neuronal RARβ Signaling Modulates PTEN Activity Directly in Neurons and via Exosome Transfer in Astrocytes to Prevent Glial Scar Formation and Induce Spinal Cord Regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(47), pp.15731–45.

Gross, J.C. et al., 2012. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(10), pp.1036–1045.

Guduric-Fuchs, J. et al., 2012. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*, 13(1), p.357.

Han, S.P. et al., 2010. Functional implications of the emergence of alternative splicing in hnRNP A/B transcripts. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(9), pp.1760–8.

Harding, C. & Stahl, P., 1983. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 113(2), pp.650–658.

Harraz, M.M. et al., 2012. MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), pp.18962–7.

Haynes, K.A. et al., 2012. A sensitive switch for visualizing natural gene silencing in single cells. *ACS synthetic biology*, 1(3), pp.99–106.

Hemming, F.J. et al., 2004. Early increase of apoptosis-linked gene-2 interacting protein X in areas of kainate-induced neurodegeneration. *Neuroscience*, 123(4), pp.887–95.

Hsu, C. et al., 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of cell biology*, 189(2), pp.223–32.

Huotari, J. & Helenius, A., 2011. Focus Review Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30, pp.3481–3500.

Hurley, J.H. & Hanson, P.I., 2010. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(8), pp.556–66.

Iavello, A. et al., 2016. Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(4), pp.958–966.

Janas, T. et al., 2015. Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Letters*, 589(13), pp.1391–1398.

Johnstone, R.M. et al., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry*, 262(19), pp.9412–20.

Jovicic, A. et al., 2013. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms. *PloS one*, 8(1), p.e54222.

Jovičić, A. et al., 2013. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(12), pp.5127–37.

Kalra, H. et al., 2012. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biology*, 10(12), p.e1001450.

Kalra, H., Drummen, G.P.C. & Mathivanan, S., 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International journal of molecular sciences*, 17(2), p.170.

Katoh, K. et al., 2003. The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *The Journal of biological chemistry*, 278(40), pp.39104–13.

Kim, D.-K. et al., 2013. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 2.

Koppers-Lalic, D. et al., 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell reports*, 8(6), pp.1649–58.

Kosaka, N. et al., 2010. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), pp.17442–17452.

Kowal, J. et al., 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), pp.E968–E977.

Krämer-Albers, E.-M. et al., 2007. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics. Clinical applications*, 1(11), pp.1446–61.

Krol, J. et al., 2010. Characterizing Light-Regulated Retinal MicroRNAs Reveals Rapid Turnover as a Common Property of Neuronal MicroRNAs. *Cell*, 141(4), pp.618–631.

Kügler, S., Kilic, E. & Bähr, M., 2003. Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene therapy*, 10(4), pp.337–47.

Lachenal, G. et al., 2011. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and cellular neurosciences*, 46(2), pp.409–18.

Laulagnier, K., Motta, C., et al., 2004. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochemical Journal*, 380(1), pp.161–171.

Laulagnier, K., Grand, D., et al., 2004. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Letters*, 572(1-3), pp.11–14.

Letellier, M. et al., 2014. miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling. *Nature neuroscience*, 17(8), pp.1040–2.

Lin, S. & Gregory, R.I., 2015. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), pp.321–333.

Lippi, G. et al., 2011. Targeting of the Arpc3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. *The Journal of Cell Biology*, 194(6), pp.889–904.

Llorente, A. et al., 2013. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(7), pp.1302–9.

Lopez-Verrilli, M.A., Picou, F. & Court, F.A., 2013. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia*, 61(11), pp.1795–806.

Lugli, G. et al., 2005. Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *Journal of neurochemistry*, 94(4), pp.896–905.

Mahul-Mellier, A.-L. et al., 2008. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*, 283(50), pp.34954–65.

Mahul-Mellier, A.-L. et al., 2006. Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(2), pp.542–9.

Matsuo, H. et al., 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5657), pp.531–4.

Matteoli, M. et al., 1996. Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), pp.13310–5.

Mayor, S. & Pagano, R.E., 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(8), pp.603–612.

Mercer, J. & Helenius, A., 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology*, 11(5), pp.510–20.

Mercier, V. et al., 2016. ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis and signaling. *Scientific reports*, 6, p.26986.

Missotten, M. et al., 1999. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell death and differentiation*, 6(2), pp.124–9.

Mittelbrunn, M. et al., 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications*, 2, p.282.

Möbius, W. et al., 2002. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 50(1), pp.43–55.

Montecalvo, A. et al., 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), pp.756–66.

Morel, L. et al., 2013. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *The Journal of biological chemistry*, 288(10), pp.7105–16.

Morelli, A.E. et al., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), pp.3257–66.

Morita, E. et al., 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO journal*, 26(19), pp.4215–27.

Murrow, L., Malhotra, R. & Debnath, J., 2015. ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function. *Nature cell biology*, 17(3), pp.300–10.

Nolte-'t Hoen, E.N.M. et al., 2012. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic acids research*, 40(18), pp.9272–85.

Odorizzi, G., 2006. The multiple personalities of Alix. *Journal of cell science*, 119(Pt 15), pp.3025–32.

Olde Loohuis, N.F.M. et al., 2012. MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(1), pp.89–102.

Pan, B.T. et al., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 101(3), pp.942–8.

Parolini, I. et al., 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(49), pp.34211–22.

Pathania, M. et al., 2012. miR-132 Enhances Dendritic Morphogenesis, Spine Density, Synaptic Integration, and Survival of Newborn Olfactory Bulb Neurons M. Zochowski, ed. *PLoS ONE*, 7(5), p.e38174.

Petiot, A. et al., 2008. Alix differs from ESCRT proteins in the control of autophagy. *Biochemical and biophysical research communications*, 375(1), pp.63–8.

Phuyal, S. et al., 2014. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *The FEBS journal*, 281(9), pp.2214–27.

Potolicchio, I. et al., 2005. Proteomic Analysis of Microglia-Derived Exosomes: Metabolic Role of the Aminopeptidase CD13 in Neuropeptide Catabolism. *The Journal of Immunology*, 175(4), pp.2237–2243.

Raiborg, C. & Stenmark, H., 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458(7237), pp.445–52.

Rodriguez, A. et al., 2008. Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence Microscopy Images B. Sabatini, ed. *PLoS ONE*, 3(4), p.e1997.

Roucourt, B. et al., 2015. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Nature Publishing Group*, 25(25).

Saba, R. et al., 2012. Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons. *Molecular and cellular biology*, 32(3), pp.619–32.

Savina, A. et al., 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp.20083–20090.

Savina, A. et al., 2005. Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner. *Traffic*, 6(2), pp.131–143.

Scheffer, L.L. et al., 2014. Mechanism of Ca^{2+}-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications*, 5, p.5646.

Schmidt, M.H.H. et al., 2004. Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Molecular and cellular biology*, 24(20), pp.8981–93.

Schratt, G., 2009. microRNAs at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), pp.842–849.

Schratt, G.M. et al., 2006. ARTICLES A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. , 439(January), pp.283–289.

Siegel, G. et al., 2009. A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nature cell biology*, 11(6), pp.705–16.

Sinha, S. et al., 2016. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *The Journal of cell biology*, 214(2), pp.197–213.

Siomi, H. & Siomi, M.C., 2009. RISC hitches onto endosome trafficking. *Nature cell biology*, 11(9), pp.1049–51.

Sobo, K. et al., 2007. Late Endosomal Cholesterol Accumulation Leads to Impaired Intra-Endosomal Trafficking R. Valdivia, ed. *PLoS ONE*, 2(9), p.e851.

Song, K. et al., 2015. MiR-122 in hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection. *World journal of hepatology*, 7(3), pp.498–506.

Stenqvist, A.-C. et al., 2013. Exosomes Secreted by Human Placenta Carry Functional Fas Ligand and TRAIL Molecules and Convey Apoptosis in Activated Immune Cells, Suggesting Exosome-Mediated Immune Privilege of the Fetus. *The Journal of Immunology*, 191(11), pp.5515–5523.

Strack, B. et al., 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, 114(6), pp.689–99.

Strappazzon, F. et al., 2010. Alix is involved in caspase 9 activation during calcium-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(1), pp.64–9.

Stuffers, S. et al., 2009. Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), pp.925–937.

Svensson, K.J. et al., 2013. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *The Journal of biological chemistry*, 288(24), pp.17713–24.

Taylor, A.R. et al., 2007. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Developmental neurobiology*, 67(13), pp.1815–29.

Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), pp.581–593.

Tian, T. et al., 2013. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of cellular physiology*, 228(7), pp.1487–95.

Tian, T. et al., 2014. Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), pp.22258–22267.

Trajkovic, K. et al., 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), pp.1244–7.

Trioulier, Y. et al., 2004. Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *The Journal of biological chemistry*, 279(3), pp.2046–52.

Valadi, H. et al., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), pp.654–9.

Vance, J.E., 2015. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 16(1), pp.1–18.

Villarroya-Beltri, C. et al., 2014. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*, 28, pp.3–13.

Villarroya-Beltri, C. et al., 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. , pp.1–10.

Vo, N. et al., 2005. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), pp.16426–31.

Williams, R.L. & Urbé, S., 2007. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), pp.355–368.

Wubbolts, R. et al., 2003. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp.10963–10972.

Xin, H. et al., 2012. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(7), pp.1556–64.

Ye, Y. et al., 2016. Role of MicroRNA in Governing Synaptic Plasticity. *Neural Plasticity*, 2016, pp.1–13.

Zhang, J. et al., 2015. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1), pp.17–24.

Zhen, Y. & Stenmark, H., 2015. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(17), pp.3171–3176.

Zhou, J. et al., 2014. MiR-20a inhibits cutaneous squamous cell carcinoma metastasis and proliferation by directly targeting LIMK1. *Cancer biology & therapy*, 15(10), pp.1340–9.

Zhou, X. et al., 2010. Decoding the intrinsic mechanism that prohibits ALIX interaction with ESCRT and viral proteins. *The Biochemical journal*, 432(3), pp.525–34.

Annexe

Biochemical Society TRANSACTIONS
Biochemical Society Transactions www.biochemsoctrans.org

Exosomes as a novel way of interneuronal communication

Mathilde Chivet*†, Charlotte Javalet*†, Fiona Hemming*†, Karin Pernet-Gallay†‡, Karine Laulagnier*†, Sandrine Fraboulet*† and Rémy Sadoul*†[1]

*Inserm, U836, Equipe 2, Neurodégénérescence et Plasticité, Grenoble, France, †Université Joseph Fourier, Grenoble Institute of Neuroscience, Grenoble, France and ‡Inserm, U836, Plateforme de microscopie, Grenoble, France

Abstract

Exosomes are small extracellular vesicles which stem from endosomes fusing with the plasma membrane; they contain lipids, proteins and RNAs that are able to modify receiving cells. Functioning of the brain relies on synapses, and certain patterns of synaptic activity can change the strength of responses at sparse groups of synapses, to modulate circuits underlying associations and memory. These local changes of the synaptic physiology in one neuron driven by another have, so far, been explained by classical signal transduction modulating transcription, translation and post-translational modifications. We have accumulated *in vitro* evidence that exosomes released by neurons in a way depending on synaptic activity can be recaptured by other neurons. Some lipids, proteins and RNAs contained in exosomes secreted by emitting neurons could directly modify signal transduction and protein expression in receiving cells. Exosomes may be an ideal mechanism for anterograde and retrograde information transfer across synapses underlying local changes in synaptic plasticity. Exosomes might also participate in the spreading across the nervous system of pathological proteins such as PrP^{Sc} (abnormal disease-specific conformation of prion protein), APP (amyloid precursor protein) fragments, phosphorylated tau or α-synuclein.

Introduction

The function of the brain relies on the capacity of billions of synapses to transmit patterns of electrical information through neuronal circuits. Reinforcement of circuits underlying associations and memory is based on the ability of chemical synapses to be individually modified after specific patterns of stimulation. The increase or decrease in the strength of synaptic responses requires structural modifications of both pre- and post-synaptic parts, which must be sustained in the long term through modifications in gene expression. Changes in one neuron driven by another have, so far, been explained by classical signal transduction: neurotransmitters released presynaptically bind to postsynaptic receptors allowing calcium entry and activating other second messengers in the postsynaptic cell. This also leads to the release by cell bodies and dendrites of retrograde signals acting presynaptically [1]. Second messengers and enzymatic activities influence, both transiently and durably, effectors of synaptic physiology (adhesion molecules, neurotransmitter receptors, cytoskeleton anchors, etc.) through post-translational modifications and changes in gene expression [2]. The efficacy of such processes must deal with the extreme compartmentalization of the parenchyma. Indeed, control of transcription occurs in the nucleus sometimes several millimetres away from synapses undergoing plastic changes. Some of the transcripts are then transported along dendrites and translated at specific synapses to sustain changes in activity, among thousands of others that remain unchanged. Regulation of translation is another aspect of synaptic plasticity, and numerous demonstrations show that miRNAs (microRNAs), which are expressed within dendrites, regulate translation of targets mediating dendritic growth [3,4].

Our hypothesis is that exosomes may constitute a novel mechanism of interneuronal transfer of molecules used during plastic changes in the brain. For the sake of clarity, the term exosome refers to microvesicles formed through budding of endosomal membranes inside MVBs (multivesicular bodies), and released in the extracellular milieu after fusion of these endosomes to the plasma membrane. In non-neuronal cells, exosomes were shown to transfer membrane and cytoplasmic proteins [5,6], as well as lipids involved in signal transduction [7,8]. Exosomes also contain RNAs; once in the receiving cells, exosomal mRNAs can be translated [9] and small RNAs, including miRNAs, mediate gene silencing [10–12]. Thus, if it exists, the interneuronal anterograde and retrograde exchange of exosomal lipids, proteins and RNAs would represent an ideal way for mediating the synaptic changes necessary for plasticity; direct information transfer allowed by exosomes would be far more efficient than that allowed by direct cell–cell contacts or secreted soluble factors.

Several criteria must be fulfilled for exosomes to play a role in the plasticity of the nervous system: (i) MVBs must

Key words: exosome, microvesicle, neurodegeneration, neuron, synaptic plasticity.

Abbreviations used: Alix, ALG-2 (apoptosis-linked gene 2)-interacting protein X; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid; APP, amyloid precursor protein; CNS, central nervous system; ILV, intraluminal vesicle; LTP, long-term potentiation; miRNA, microRNA; MVB, multivesicular body; PrP^{Sc}, abnormal disease-specific conformation of prion protein; Tsg101, tumour susceptibility gene 101.

[1]To whom correspondence should be addressed (email remy.sadoul@ujf-grenoble.fr).

©The Authors Journal compilation ©2013 Biochemical Society

be present in neurons, (ii) fusion of endosomes with the plasma membrane must be under control of synaptic activity, and (iii) exosomes released by one neuron should transfer biologically active material, which influences the biology of receiving neurons.

Neuronal endosomes underlie several aspects of synaptic plasticity

In neurons, endosomes are present in both pre- and post-synaptic compartments. Electron microscopy observations of the adult hippocampus revealed the presence of MVBs appearing as large vacuoles delimited by a single membrane and containing a varying number of 50–80 nm membrane vesicles. MVBs are mainly detected in dendritic shafts and inside a limited number of spines, which are small protrusions containing postsynaptic parts of glutamatergic synapses [13]. Several *in vivo* paradigms revealed that movements of MVBs to synapses of hippocampal neurons are tightly linked to synaptic plasticity [14]. In cultured neurons, LTP (long-term potentiation), a form of synaptic plasticity now widely accepted as a model of learning and memory processes, correlates with the recruitment of recycling endosomes into or near spines, where they fuse with the plasma membrane [15,16]. Fusion of the endosomal membrane to the surface increases the spine volume and thereby synaptic efficiency. Furthermore, glutamate receptors present in the limiting membrane of endosomes become inserted at the neuronal surface, diffuse laterally to synaptic sites and accumulate at postsynaptic densities. Since the new inserted receptors are ionotropic, their increase in number allows stronger depolarization following given presynaptic release of glutamate, thus making a more efficient synapse. Live imaging showed the requirement of Rab11 or syntaxin 13 for the fusion of dendritic endosomes at the plasma membrane [17]. Accordingly, expression of a dominant-negative form of Rab11 was found to inhibit LTP in slice cultures [15,18]. Thus fusion of endosomes with the plasma membrane of dendrites is tightly regulated by synaptic activity and is necessary for the early steps of synaptic plasticity.

Neurons secrete exosomes in a tightly regulated way

We demonstrated previously that cultured cortical neurons release exosomes [19]. As in the case of other cells, exosomes isolated from neuronal culture media floated on sucrose gradients at a density of 1.1–1.2 g/ml and contained both Alix [ALG-2 (apoptosis-linked gene 2)-interacting protein X] and Tsg101 (tumour susceptibility gene 101). Alix is a cytoplasmic protein which interacts with Tsg101 of the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) machinery necessary for the formation of ILVs (intraluminal vesicles) accumulating inside MVBs [20–22]. Endophilin A, which also interacts with Alix [23], was not detected in exosomes, showing that entry of cargoes into ILVs is regulated. Incorporation of membrane proteins in ILVs is also selective as exosomes contained AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid), but not NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) glutamate synaptic receptors.

Three other studies reported constitutive secretion of exosomes by neurons [24–26]. These studies, as well as our initial one, used embryonic neurons cultured for only 3–8 days. In short-term cultures, neurons make only a few synapses and neurite outgrowth is still ongoing. Thus exosomal release could reflect in part the fusion of late endosomes/lysosomes at growth cones known to occur during neurite elongation [27]. To test whether fully mature neurons can also release exosomes, we have studied exosomal release from cortical neurons cultured for 15 days [28]. Even if the basic level of exosomal release by these cultures was very low, it was drastically increased after raising cytosolic calcium with a calcium ionophore. Electron microscopic examination of cultures treated for 1 min with ionomycin revealed clusters of exosomes at the surface of dendrites, thus visualizing the fusion of MVBs with the plasma membrane. These cultures, which contain both glutamatergic and GABAergic neurons making functional networks, were used to test the influence of synaptic activity on exosomal release. For this, we incubated the cultures with GABA (γ-aminobutyric acid) receptor antagonists, such as picrotoxin or bicucullin, which alleviate inhibitory activities within the networks and thereby increase synaptic glutamatergic activity. Such treatments rapidly (10–15 min) and massively augmented the secretion of exosomes in a way that is dependent on glutamate ionotropic receptors [28]. Taken together, our data suggest that calcium entry through synaptic glutamate receptors is a potent activator of MVB fusion to the plasma membrane and thereby of exosome secretion. The enhanced secretion of AMPA-receptor-containing exosomes following glutamatergic synaptic activation, underlines exosomal release as a way of local elimination of receptors at synapses undergoing plastic changes. The loss of AMPA receptors upon extensive synaptic activation could be a mechanism of homoeostatic synaptic scaling, necessary for adjusting the strength of all of a neuron's excitatory synapses to stabilize firing [29]. In this scenario, regulation of the pool of surface synaptic receptors by exosome secretion would be a local event, avoiding retrograde transport of MVBs necessary to hydrolyse the receptors in lysosomes, which are only present in proximal dendrites and soma.

The fate of exosomes released by neurons

In the immune system, exosomes were first shown to be internalized by [30], and more recently to fuse directly with [12], the plasma membrane of dendritic cells. Exosomes released in the CNS (central nervous system) parenchyma could be phagocytosed by macrophage-like cells, such as oligodendrocyte-derived exosomes which are internalized by microglial cells [31]. Astrocyte endfeet enwrapping a number of glutamatergic synapses can also endocytose/phagocytose cellular debris [32] and could thus capture exosomes released

©The Authors Journal compilation ©2013 Biochemical Society

at synapses. Transfer of exosomes might also occur between spines of the same neuron or across synapses to end up in afferent neurons. Indeed, the diameter of neuronal exosomes (~60 nm) is compatible with endocytosis by clathrin-coated pits at presynaptic boutons, spines or dendritic shafts [33]. In line with this, we recently found that a fragment of tetanus toxin, known to cross synapses *in vivo*, is endocytosed by neurons to end up inside MVBs and be released by way of exosomes [28]. Neuronal exosomes containing the toxin incubated on cultured neurons bound to and entered synapses presynaptically (M. Chivet, C. Javalet and R. Sadoul, unpublished work), thus suggesting that the toxin crosses synapses in association with exosomes. Theoretically, membrane of exosomes could fuse with the plasma membrane or, if they are endocytosed, with endosomal membranes. Backfusion of ILVs has been demonstrated to occur inside MVBs [34] and could thus concern exosomes, which have the same origin. Fusion of exosomes with cell-surface, or endosomal, membranes, would add new transmembrane proteins acting on the synaptic physiology such as AMPA receptors. It would also allow the release into the cytosol of the exosome content, including signal tranduction molecules capable of modifying receiving neurons. We have recently observed that exosomes secreted by neurons contain miRNAs (M. Chivet, C. Javalet and R. Sadoul, unpublished work). Given that single miRNAs have multiple targets, the impact of exosome-mediated local transfer of miRNA on the pattern of translated mRNAs in receiving neurons may be quite extensive. Accordingly, Xin et al. [35] reported recently that exosomes secreted by mesenchymal cells influence neurite outgrowth apparently through *miR-133b* contained inside exosomes.

Relevance of neuronal exosomes for neurodegenerative diseases

Exosomes carry pathogenic proteins such as α-synuclein, PrP^{Sc} (abnormal disease-specific conformation of prion protein), APP (amyloid precursor protein) C-terminal fragments and phosphorylated tau, which are involved in Parkinson's, prion and Alzheimer's diseases respectively. The scrapie form of the prion protein (i.e. PrP^{Sc}) can be secreted via exosomes and remains infectious under this form [36]. Thus, similarly to tetanus toxin, prions could propagate from the periphery to the CNS by way of trans-synaptic exchange of exosomes. α-Synuclein secreted together with exosomes released by neuroblastoma cells causes cell death of recipient neuronal cells suggesting that α-synuclein secretion via exosomes serves to amplify and propagate Parkinson's disease-related pathology [37]. The catabolism of APP giving rise to the amyloidogenic C-terminal APP fragment occurs in endosomes and this fragment, as well as Aβ (amyloid β-peptide), is released by way of exosomes [25,38–40]. Furthermore, whereas endogenous tau was not secreted inside neuronal exosomes [19], it was detectable in exosomes from cells overexpressing the protein, suggesting that exosomes may contribute to eliminate the excess of intracellular tau [41,42]. The tau pathology could spread *in vivo* through trans-synaptic transmission, and it is tempting to speculate that exosomes contribute to the spreading of the Alzheimer's disease pathology throughout interconnected cortical areas [43]. These puzzling hypotheses require *in vivo* work (i) to show that exosomal release from MVBs occurs *in situ*, (ii) to find out the privileged site of this release, and (iii) to demonstrate trans-synaptic exchange of exosomes. Furthermore, even though the activity-dependent release of exosomes suggests a genuine function of exosomes in synaptic plasticity, molecular tools to specifically block MVB fusion with the plasma membrane must be developed to test this hypothesis. Nevertheless, studies on exosomes in the CNS are bound to shed new light on intercellular exchanges within the brain and to open new avenues towards understanding how neurodegenerative diseases spread over time throughout the nervous system.

Funding

M.C. and C.J. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Joseph Fourier, Fondation France Alzheimer and ANR [grant number 08-Blanc-0271 (to R.S.)].

References

1 Regehr, W.G., Carey, M.R. and Best, A.R. (2009) Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. Neuron **63**, 154–170
2 Caroni, P., Donato, F. and Muller, D. (2012) Structural plasticity upon learning: regulation and functions. Nat. Rev. Neurosci. **13**, 478–490
3 Qureshi, I.A. and Mehler, M.F. (2012) Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. **13**, 528–541
4 Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J., Kane, C. et al. (2009) A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. Nat. Cell Biol. **11**, 705–716
5 Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C. et al. (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. Blood **104**, 3257–3266
6 Thery, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat. Rev. Immunol. **2**, 569–579
7 Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.P., Bonnerot, C., Perret, B. and Record, M. (2004) PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. FEBS Lett. **572**, 11–14
8 Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S. et al. (2010) Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. J. Lipid Res. **51**, 2105–2120
9 Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J. and Lotvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat. Cell Biol. **9**, 654–659
10 Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T. (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. J. Biol. Chem. **285**, 17442–17452
11 Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Wurdinger, T. and Middeldorp, J.M. (2010) Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **107**, 6328–6333

©The Authors Journal compilation ©2013 Biochemical Society

12 Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Beer Stolz, D., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G. et al. (2012) Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. Blood **119**, 756–766
13 Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M. and Fiala, J.C. (2002) Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. J. Neurosci. **22**, 2215–2224
14 Von Bartheld, C.S. and Altick, A.L. (2011) Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. Prog. Neurobiol. **93**, 313–340
15 Wang, Z., Edwards, J.G., Riley, N., Provance, Jr, D.W., Karcher, R., Li, X.D., Davison, I.G., Ikebe, M., Mercer, J.A., Kauer, J.A. and Ehlers, M.D. (2008) Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. Cell **135**, 535–548
16 Correia, S.S., Bassani, S., Brown, T.C., Lise, M.F., Backos, D.S., El-Husseini, A., Passafaro, M. and Esteban, J.A. (2008) Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. Nat. Neurosci. **11**, 457–466
17 Park, M., Salgado, J.M., Ostroff, L., Helton, T.D., Robinson, C.G., Harris, K.M. and Ehlers, M.D. (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. Neuron **52**, 817–830
18 Brown, T.C., Correia, S.S., Petrok, C.N. and Esteban, J.A. (2007) Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. J. Neurosci. **27**, 13311–13315
19 Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V. et al. (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. Mol. Cell. Neurosci. **31**, 642–648
20 Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K. and Sadoul, R. (1999) Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. Cell Death Differ. **6**, 124–129
21 Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R. et al. (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. Science **303**, 531–534
22 Babst, M. (2011) MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. Curr. Opin. Cell Biol. **23**, 452–457
23 Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M. and Sadoul, R. (2002) Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. J. Biol. Chem. **277**, 29108–29115
24 Ghidoni, R., Paterlini, A., Albertini, V., Glionna, M., Monti, E., Schiaffonati, L., Benussi, L., Levy, E. and Binetti, G. (2009) Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging **32**, 1435–1442
25 Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gele, P., Drobeck, H., Begard, S., Galas, M.C., Delacourte, A., Beauvillain, J.C., Buee, L. and Sergeant, N. (2007) Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. J. Biol. Chem. **282**, 18197–18205
26 Putz, U., Howitt, J., Lackovic, J., Foot, N., Kumar, S., Silke, J. and Tan, S.S. (2008) Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4 family proteins. J. Biol. Chem. **283**, 32621–32627
27 Arantes, R.M. and Andrews, N.W. (2006) A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. J. Neurosci. **26**, 4630–4637
28 Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y. and Sadoul, R. (2010) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. Mol. Cell. Neurosci. **46**, 409–418
29 Turrigiano, G.G. (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. Cell **135**, 422–435
30 Skokos, D., Botros, H.G., Demeure, C., Morin, J., Peronet, R., Birkenmeier, G., Boudaly, S. and Mecheri, S. (2003) Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses *in vivo*. J. Immunol. **170**, 3037–3045
31 Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.K. and Simons, M. (2011) Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. J. Cell Sci. **124**, 447–458
32 Haydon, P.G. and Carmignoto, G. (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. Physiol. Rev. **86**, 1009–1031
33 Lu, J., Helton, T.D., Blanpied, T.A., Racz, B., Newpher, T.M., Weinberg, R.J. and Ehlers, M.D. (2007) Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. Neuron **55**, 874–889
34 Falguieres, T., Luyet, P.P. and Gruenberg, J. (2009) Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. Exp. Cell Res. **315**, 1567–1573
35 Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, Z.G. and Chopp, M. (2012) Exosome-mediated transfer of *miR-133b* from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. Stem Cells **30**, 1556–1564
36 Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. and Raposo, G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**, 9683–9688
37 Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L. and Vekrellis, K. (2010) Cell-produced α-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. J. Neurosci. **30**, 6838–6851
38 Ghidoni, R., Paterlini, A., Albertini, V., Glionna, M., Monti, E., Schiaffonati, L., Benussi, L., Levy, E. and Binetti, G. (2011) Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging **32**, 1435–1442
39 Sharples, R.A., Vella, L.J., Nisbet, R.M., Naylor, R., Perez, K., Barnham, K.J., Masters, C.L. and Hill, A.F. (2008) Inhibition of γ-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. FASEB J. **22**, 1469–1478
40 Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P. and Simons, K. (2006) Alzheimer's disease β-amyloid peptides are released in association with exosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 11172–11177
41 Simon, D., Garcia-Garcia, E., Gomez-Ramos, A., Falcon-Perez, J.M., Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F. and Avila, J. (2012) Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. Neurodegener. Dis. **10**, 73–75
42 Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., Jackson, B., McKee, A.C., Alvarez, V.E., Lee, N.C. and Hall, G.F. (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. J. Biol. Chem. **287**, 3842–3849
43 Vingtdeux, V., Sergeant, N. and Buee, L. (2012) Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. Front. Physiol. **3**, 229

Received 18 October 2012
doi:10.1042/BST20120266

©The Authors Journal compilation ©2013 Biochemical Society

Résumé

Les exosomes sont des vésicules d'origine endosomale sécrétées par les cellules dans leur environnement après fusion à la membrane plasmique des endosomes multivésiculés. Les exosomes représentent un nouveau mode de communication entre les cellules en permettant un transfert direct de protéines, de lipides et d'ARN. L'objectif de ma thèse était d'étudier le rôle des exosomes dans la communication entre les neurones. Précédemment, le laboratoire a montré que les neurones sécrètent des exosomes de manière régulée par l'activité synaptique. Nous avons observé que les exosomes neuronaux ne sont endocytés que par les neurones. Après avoir montré qu'ils ne contiennent que des ARN courts, nous avons réalisé un séquençage complet de leurs microARN et observé que ces microARN étaient sélectivement exportés dans les exosomes. Nos observations suggèrent que les microARN contenus dans les exosomes peuvent modifier la physiologie des neurones receveurs. Nos résultats renforcent l'hypothèse du rôle des exosomes dans la communication entre les neurones via le transfert de microARN.

Abstract

Exosomes are vesicles of endocytic origin released by cells into their environment following fusion of multivesicular endosomes with the plasma membrane. Exosomes represent a novel mechanism of cell communication allowing direct transfer of proteins, lipids and RNA. The goal of my PhD thesis was to study that exosomes represent a novel way of interneuronal communication. Our team has previously reported that neurons release exosomes in a way tightly regulated by synaptic activity. We observed that exosomes released by neurons are only endocytosed by neurons. We found that exosomes contain only small RNA and did a deep sequencing of all their microRNA. MicroRNA are selectively exported into exosomes. It seems that exosomal microRNA can modify the physiology of receiving neurons. Our results strengthen the hypothesis of the role of exosomes in the interneuronal communication by the way of microARN transfert.