



**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE
ET DE LA SANTÉ - ED62**

UNITÉ DE NEUROBIOLOGIE DES CANAUX IONIQUES ET DE LA SYNAPSE
INSERM UMR1072 UNIS

THÈSE

*Présentée et publiquement soutenue
par*

Richard DESPLANTES

Le 08 Septembre 2017

**EXPRESSION EXOSOMALE DE PROTÉINES SYNAPTIQUES
CIBLES D'INTÉRÊT PHARMACOLOGIQUES**

Pour obtenir le grade de DOCTEUR d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
SPÉCIALITÉ : Neurosciences

Membres du Jury de la Thèse :

Dr. Bernard Poulain	Rapporteur
Dr. Guillaume Van Niel	Rapporteur
Pr. Nouara Yah	Examineur- Présidente
Dr. Didier Hilaire	Examineur
Dr. José Boucraut	Examineur
Dr. Oussama El Far	Directeur de thèse



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ - ED62

UNITÉ DE NEUROBIOLOGIE DES CANAUX IONIQUES ET DE LA SYNAPSE

INSERM UMR1072 UNIS

THÈSE

*Présentée et publiquement soutenue
par*

Richard DESPLANTES

Le 08 Septembre 2017

EXPRESSION EXOSOMALE DE PROTÉINES SYNAPTIQUES CIBLES D'INTÉRÊT PHARMACOLOGIQUES

Pour obtenir le grade de DOCTEUR d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
SPÉCIALITÉ : Neurosciences

Membres du Jury de la Thèse :

Dr. Bernard Poulain	Rapporteur
Dr. Guillaume Van Niel	Rapporteur
Pr. Nouara Yah	Examineur- Présidente
Dr. Didier Hilaire	Examineur
Dr. José Boucraut	Examineur
Dr. Oussama El Far	Directeur de thèse

Remerciements

Pour commencer, je souhaite remercier très sincèrement Oussama, premièrement pour m'avoir donné ma chance (pas trop de regrets j'espère ?), deuxièmement pour son sérieux dans l'encadrement de mes travaux, mais aussi et surtout pour avoir été un directeur de thèse aussi accessible et bienveillant. J'ai véritablement apprécié ta capacité à accueillir le dialogue ainsi que ta patience inébranlable, même face à mes questions les plus naïves. Au bilan de ces quelques années, je pense avoir beaucoup appris à tes côtés, et m'estime quelque part chanceux de n'avoir à garder qu'un bon souvenir de notre relation.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, et particulièrement M. Bernard Poulain et M. Guillaume Van Niel pour leur investissement en tant que rapporteurs de cette thèse. Aussi, le fait de pouvoir compter José au sein de ce jury représente une certaine satisfaction, lui qui aura accompagné mes premiers pas dans « la recherche ».

Je suis reconnaissant envers tous les membres de l'équipe de m'avoir épaulé chacun à leur façon durant les différentes étapes de mon parcours au laboratoire. Parmi eux, je remercie tout spécialement Christian qui a beaucoup apporté au projet. Clairement, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans ton implication. Je garde en mémoire les journées passées à dompter les plasmides récalcitrants aux côtés de Youyou, les enseignements de Cécile et son goût pour la rigueur dans les manips, les moments partagés avec Marion grâce à qui les « bonnes pratiques » perdureront. Merci aussi à Yves d'avoir été constamment présent pour nous aiguiller sur certains aspects du projet, ainsi qu'à Mike pour nous avoir fait profiter de son expérience au travers de remarques avisées.

Je ne saurai oublier mon passage à Montpellier, qui sonna le départ de ce projet. Je ne peux qu'être reconnaissant envers Robert de m'avoir accueilli au sein de son entreprise Ciloa, et l'ensemble de cette « équipe bis » pour m'avoir aidé à remplir la « mission exosome ». Une pensée toute particulière pour Manuela et Maëlle qui auront été parmi les plus impliquées, et mention spéciale au facétieux Renaud, pour son soutien de premier plan.

Plus largement, mes remerciements vont à l'ensemble des membres de l'unité, qui chacun ont contribué à entretenir cette ambiance si appréciable à l'UNIS. Merci à Dominique de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et à Jean-Marc pour ses remarques pertinentes et sa propension à détendre l'atmosphère. Merci aux autres thésards et post-docs que j'ai eu plaisir à côtoyer, et ce, pas uniquement dans le cadre du labo. Parmi eux, je me dois de remercier plus particulièrement Yanis pour son soutien, son aide pendant la période de rédaction, et le souci qu'il aura eu d'essayer me garder en pleine forme physique. Aussi, un grand merci à Jennifer et Fanny pour leur remarquable soutien logistique.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui, au-delà du labo, m'ont aidé à mener à bien ce projet. Géraldine pour sa disponibilité et son enthousiasme à la plateforme, Marie-Pierre pour son aide précieuse avec la microscopie et Jacques Fantini pour son renfort dans nos histoires d'interaction.

Je remercie encore tous les amis qui m'ont soutenu, notamment le groupe de thésards Marseillais formé par les anciens du MASTER.

Merci à Erika d'avoir été mon premier soutien dans cette aventure, et infiniment plus que cela...

Enfin, je ne saurai comment remercier mes parents qui m'ont permis de poursuivre les études qui m'ont inspirées, et qui, à défaut de comprendre exactement ce que j'ai fait durant ces quelques années, n'ont jamais cessé de m'apporter leur soutien. Une pensée pour mon grand-père et ses indéfectibles encouragements.

RESUME

Les neurotoxines botuliques (BoNTs) sécrétées par des bactéries du genre *Clostridium*, sont à l'origine du botulisme humain et animal qui se traduit par une paralysie flasque due au blocage de la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire. Par ailleurs, ces neurotoxines présentent un intérêt thérapeutique majeur pour le traitement d'affections neurologiques multiples. La BoNT/B se lie et pénètre dans les neurones par l'intermédiaire de deux récepteurs membranaires: la synaptotagmine2 (SYT2) et un poly-sialoganglioside de type GT1b.

En utilisant une technologie innovante, j'ai validé l'utilité d'un système permettant de cibler vers les exosomes des protéines recombinantes complexes dont les récepteurs protéiques des BoNTs. Des exosomes exprimant un canal potassium hétérotétramérique, une protéine de type GPCR ou la SYT2 ont été ainsi produits. Des tests de liaison de ligands spécifiques et dépendants d'une conformation native de ces récepteurs ont été réalisés avec succès. La BoNT/B se lie sur des exosomes exprimant la SYT2 en présence de GT1b selon un modèle d'interaction 1 :1, avec une affinité ($K_D = 0.6$ nM) comparable à celle qui est trouvée sur des préparations de terminaisons nerveuses natives. L'expression de protéines membranaires complexes dans des exosomes représente donc une technologie prometteuse pour de nombreuses études pharmacologiques et le développement de nouveaux médicaments.

Dans un deuxième volet de ce travail, j'ai montré que la BoNT/B se lie avec une faible affinité et de façon très transitoire sur le GT1b associé à des exosomes et que cette interaction n'est pas détectée dans un contexte cellulaire. En revanche la BoNT/B lie des exosomes exprimant la SYT2 avec une affinité de 40 nM ainsi que la SYT2 transfectée dans des cellules PC12 en culture. La présence de GT1b dans les exosomes SYT2 induit un gain d'affinité d'un facteur 65, essentiellement par un accroissement de la constante cinétique d'association de la BoNT/B. J'ai pu établir que le domaine juxta-membranaire extra cellulaire de la SYT2 lie directement la tête polaire du GT1b avec une affinité de 3 μ M, interaction confirmée par modélisation moléculaire. La première lysine du domaine extra cellulaire (K60) est directement impliquée dans l'interaction avec le GT1b et sa mutation affecte la liaison de la BoNT/B sur le complexe SYT2/GT1b. A partir de ces résultats, nous proposons un nouveau modèle de reconnaissance des terminaisons synaptiques par la BoNT/B dans lequel, la toxine interagit avec un co-récepteur SYT2/GT1b préalablement assemblé. Ceci représenterait une première étape déterminante dans la séquence d'évènements conduisant à l'intoxication du neurone.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	15
I. LES NEUROTOXINES BOTULIQUES : DU BOTULISME AUX APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES..	17
1. Découverte du botulisme.....	17
a. Une maladie séculaire.....	17
i. Agents du botulisme.....	17
ii. Le botulisme à travers les âges.....	18
b. Observations et avancées du 19 ^{ième} siècle.....	19
c. Identification et caractérisation de l'agent infectieux au 20 ^{ième} siècle.....	20
2. Structure et diversité des toxines botuliques.....	23
a. Structure moléculaire des toxines botuliques.....	23
b. Diversité des toxines botuliques.....	25
i. Classification par sérotype.....	25
ii. Toxines Mosaïques.....	26
iii. Sous-types de toxines botuliques.....	27
iv. Classification des toxines botuliques par groupes physiologiques.....	29
v. Variabilité génétique des toxines botuliques.....	29
c. Organisation génomique des toxines botuliques et protéines associées.....	31
i. Organisation des loci botuliques.....	31
ii. Structure des complexes botuliques.....	32
iii. Fonction des NAPs.....	34
3. Mécanisme d'action des neurotoxines botuliques.....	36
a. Transmission synaptique.....	36
i. Principe et vue d'ensemble.....	36
ii. Transmission de l'influx nerveux.....	38
iii. Cycle des vésicules synaptiques.....	38
iv. Libération des neurotransmetteurs.....	41
v. Machinerie moléculaire de la libération des neurotransmetteurs.....	43
b. Les étapes du blocage de la neurotransmission par les toxines botuliques.....	45
i. Ciblage spécifique des neurones périphériques.....	45
ii. Internalisation neuronale.....	46
iii. Translocation cytoplasmique.....	47
iv. Activité enzymatique.....	53
4. Botulisme.....	55
a. Symptômes et manifestations cliniques.....	55

b.	Différentes formes de botulisme	57
i.	<i>Botulisme alimentaire</i>	57
ii.	<i>Botulisme par blessure</i>	59
iii.	<i>Botulisme infantile et colonisation intestinale</i>	59
iv.	<i>Autres formes : botulisme iatrogène et inhalatoire</i>	60
5.	Applications thérapeutiques des toxines botuliques	60
a.	Injections de toxines botuliques à visée thérapeutique	60
b.	Vaccination contre le botulisme	62
c.	Développement de neurotoxines recombinantes	63
i.	<i>BoNTs hybrides et potentialisation de l'activité biologique</i>	63
ii.	<i>Extension de l'action des BoNTs aux cellules non neuronales</i>	64
iii.	<i>Modification de spécificité du substrat</i>	66
iv.	<i>Utilisation des toxines botuliques comme vecteur d'adressage neuronal</i>	66
II.	COMPLEXITÉ DU MODE DE LIAISON DES NEUROTOXINES BOTULIQUES	68
1.	Les gangliosides	68
a.	Structure, biosynthèse et fonctions	68
i.	<i>Structure et biosynthèse</i>	68
ii.	<i>Fonctions des gangliosides</i>	70
b.	Co-récepteurs des toxines botuliques	73
i.	<i>Implication dans la liaison des toxines botuliques</i>	73
ii.	<i>Etude structurale des interactions BoNT-ganglioside</i>	76
2.	Récepteurs protéiques des toxines botuliques	78
a.	Synaptotagmines	78
i.	<i>Structure et propriétés</i>	78
ii.	<i>Fonctions de SYT1 et SYT2</i>	81
iii.	<i>SYT1 et SYT2 : récepteurs de la BoNT/B</i>	82
iv.	<i>Etude structurale de l'interaction SYT2-BoNT/B</i>	84
b.	Protéines SV2	88
i.	<i>Structure et propriétés</i>	88
ii.	<i>Fonction des protéines SV2</i>	90
iii.	<i>SV2 : récepteur de la BoNT/A et de la BoNT/E</i>	93
iv.	<i>Etude structurale des complexes SV2-BoNT/A, E</i>	95
3.	Différents modèles de liaison sur le double récepteur	97
a.	Modèle de liaison séquentielle	97
b.	Modèle de liaison simultanée ?	101
III.	PROTÉINES MEMBRANAIRES ET EXPRESSION EXOSOMALE	103
1.	Expression de protéines membranaires recombinantes	103
a.	Intérêt des protéines membranaires recombinantes	103
b.	Les différents systèmes d'expression hétérologues	105
i.	<i>Bactéries</i>	105
ii.	<i>Levures</i>	106

iii. Cellules d'insectes.....	107
iv. Cellules de mammifères	108
c. Influence de l'environnement membranaire sur la fonction des PMIs.....	108
2. Les exosomes.....	112
a. Une nomenclature perfectible.....	112
b. Découverte des exosomes	113
c. Caractéristique et propriétés des exosomes	115
d. Composition moléculaire des exosomes	117
e. Biogénèse des exosomes	123
i. Corps multivésiculaires	123
ii. Machinerie ESCRT.....	123
iii. Implication de la voie ESCRT dans la biogénèse des exosomes	130
iv. Voies ESCRT-indépendantes dans la biogénèse des exosomes	132
v. Sécrétion exosomale.....	134
f. Fonctions biologiques	137
i. Rôles physiologiques et physiopathologiques	137
ii. Interaction des exosomes avec des cellules cibles	141
3. Méthodes d'adressage de protéines dans les exosomes	142
a. Expression exosomale de protéines recombinantes	142
b. La technologie Ciloa	143
i. Prérequis : lien entre exosomes et bourgeonnement viral.....	143
ii. Origine et intérêt des peptides d'adressage développés par Ciloa	146
RESULTATS.....	149
I. ARTICLE 1 : BIOSENSEURS D’AFFINITÉ UTILISANT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES NATIVES EXPRIMÉES À LA SURFACE D’EXOSOMES : APPLICATION AUX RÉCEPTEURS DE LA BONT/B	151
II. ARTICLE 2 : LE GT1B INTERAGIT AVEC LE DOMAINE EXTRACELLULAIRE DE LA SYNAPTOTAGMINE 2 FORMANT AINSI UN SITE DE HAUTE AFFINITÉ POUR LA BONT/B.....	172
DISCUSSION.....	209
BIBLIOGRAPHIE.....	227

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Quelques «grands noms» de la recherche sur le botulisme	22
Figure 2 : Chronologie des étapes clefs de la recherche sur le botulisme au 19 ^{ième} et 20 ^{ième} siècle.....	22
Figure 3 : Schéma de l'activation des précurseurs des BoNTs par clivage protéolytique.....	24
Figure 4 : Organisation des différents domaines de la BoNT/A1.....	24
Figure 5 : Arbre phylogénétique des BoNTs : sérotypes, sous-types et toxines mosaïques.	28
Figure 6 : Organisation des loci botuliques.....	30
Figure 7 : Assemblage macromoléculaire d'un L-PTC.....	33
Figure 8 : Structure moléculaire du L-PTC/A et interactions avec des hydrates de carbones.	35
Figure 9 : Schéma illustrant la propagation du potentiel d'action (PA) dans les neurones.....	37
Figure 10 : Les principales étapes de la transmission synaptique.....	39
Figure 11 : Le cycle des vésicules synaptiques impliqué dans la neurotransmission.....	40
Figure 12 : Le complexe SNARE impliqué dans la fusion des vésicules synaptiques.....	42
Figure 13 : L'assemblage du complexe SNARE responsable de la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique.....	42
Figure 14 : Liaison, internalisation et clivage protéolytique des cibles des toxines botuliques dans les terminaisons axonales.....	48-49
Figure 15 : Modèle pour la translocation cytoplasmique de la LC des BoNTs.....	51
Figure 16 : Les sites de clivage identifiés sur les protéines SNAREs pour les différentes BoNTs.....	54
Figure 17 : Inhibiteurs de sécrétion adressés dans les cellules somatotrophes de l'hypophyse.....	65
Figure 18 : Schéma de la structure du ganglioside GM1.....	69
Figure 19 : Schéma simplifié des voies de biosynthèses des gangliosides.....	71
Figure 20 : Schéma d'interaction entre la BoNT/A et un analogue du GT1b.....	77
Figure 21 : La structure de la synaptotagmine 1 (SYT1) de rat.....	79
Figure 22 : Structure cristalline de l'interface d'interaction du complexe HcB-SYT2.....	85
Figure 23 : Représentation schématique de l'interface entre BoNT/B et la SYT2.....	85
Figure 24 : Modélisation de la double liaison de la BoNT/B sur le sialyllactose et la SYT2 insérés dans des membranes.....	87
Figure 25 : Alignement de séquences entre les domaines N-terminaux de la SYT1(40-60) et de la SYT2(38-52) de rat.....	87
Figure 26 : Représentation schématique de la topologie de SV2A.....	89
Figure 27 : Modèle de liaison simultanée de la BoNT/A sur la SV2C et le GT1b.....	94
Figure 28 : Le complexe H _C /A-SV2C(L4).....	96
Figure 29 : Deux modes de liaison alternatifs de la BoNT/B sur son double récepteur.....	98
Figure 30 : Modèle du double récepteur selon Montecucco.....	99

Figure 31 : Représentation des protéines membranaires en tant que cibles thérapeutiques...	104
Figure 32 : Liaison de lipides formant un anneau lipidique à la surface d'une aquaporine...	110
Figure 33 : Observation de VEs en microscopie électronique.....	114
Figure 34 : Observation en microscopie électronique de VILs et d'exosomes.....	114
Figure 35 : Différences d'aspect des exosomes en microscopie électronique en fonction du protocole de préparation employé.....	116
Figure 36 : Protocole classique de purification d'exosomes à partir de surnageant de culture cellulaire par une méthode de centrifugations différentielles.....	118
Figure 37 : Schéma du transport de protéines membranaires au travers de différents compartiments cellulaires et leur adressage exosomal permettant leur transfert d'une cellule sécrétrice à une cellule receveuse.....	119
Figure 38 : Schéma de la composition globale des VEs en protéines, lipides et acides nucléiques.....	121
Figure 39 : Schéma de la double fonction des corps multivésiculaires (CMVs).....	124
Figure 40 : Représentation de l'implication de la machinerie ESCRT (colliers bleus) dans différents processus cellulaires.....	124
Figure 41 : Les différentes sous unités composant le complexe ESCRT-0.....	127
Figure 42 : Les différentes sous unités composant le complexe ESCRT-I.....	127
Figure 43 : Les différentes sous unités composant le complexe ESCRT-II.....	129
Figure 44 : Modèles décrivant le rôle d'ESCRT-III dans la biogénèse des CMVs.....	131
Figure 45 : Adressage exosomal de la syndécane par la machinerie ESCRT.....	133
Figure 46 : Machineries moléculaires impliqués dans la biogénèse des exosomes et VEs....	135
Figure 47 : Les protéines Rabs associées à différentes voies de sécrétion exosomales.....	135
Figure 48 : Les différentes voies de présentation d'antigènes par les exosomes.....	138
Figure 49 : Structure du précurseur polypeptidique Gag de HIV-1 et domaines fonctionnels.....	144
Figure 50 : Schéma représentant les dernières étapes de la réplication de HIV-1.....	145
Figure 51 : Représentation schématique de la protéine chimérique CDTM-BLV-CD8.....	147
Figure 52 : Nouveau modèle de liaison des BoNTs sur leur double récepteur.....	224-225

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : <i>Classification des Clostridium produisant des toxines botuliques.....</i>	30
Tableau 2 : <i>Les récepteurs protéiques des différents sérotypes de BoNTs.....</i>	44
Tableau 3 : <i>Caractéristiques de survie, de croissance et de toxinogénèse de C. botulinum....</i>	58
Tableau 4 : <i>Les différents types de gangliosides liés par chacun des sérotypes de toxines botuliques.....</i>	74
Tableau 5 : <i>Liste des sous unités composant les différents complexes ESCRT et protéines associées chez les métazoaires et la levure.....</i>	126

LISTE DES ABREVIATIONS

BoNT: Botulinum NeuroToxin

bont: gène de la BoNT

Ca²⁺: ion Calcium

CMV: Corp MultiVésiculaire

EGF: Epidermal Growth Factor

ESCRT: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport

FDA: U.S Food and Drug Administration

GABA: Acide Gamma–AminoButyrique

Gal: Galactose

GalNAc: N-AcétylGalactosamine

GalNAcT: GalNAc Transférase

GPCR: G Protein-Coupled Receptor

HA: HémAgglutinine

L-PTC: Large Progenitor Toxin Complex

M-PTC: Medium Progenitor Toxin Complex

MSF: Major Facilitator Superfamily

NAP: Neurotoxin Associated Protein

Neu5Ac: N-acetylNeuraminic Acid (= acide sialique)

JNM: Jonction NeuroMusculaire

NSF: N-ethylmaleimide-Sensitive Factor

NTNH: Non-Toxic Non-Hemagglutinine

OrfX: Open reading frame X

PA: Potentiel d'Action

PMI: Protéine Membranaire Intrinsèque

PPMP: 1-Phenyl-2-Palmitoyl-3-Morpholino-1-Propanol

Sia: acide Sialique

SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SNAP: SyNaptosomal Associated Protein

SPR: Résonance Plasmonique de Surface

STX : SynTaXin

SV2: Synaptic Vesicle glycoprotein 2

SYT: SYnptoTagmin

TeNT: Tetanus NeuroToxin

TfR: Transferrin Receptor

TrkA: Tropomyosin receptor kinase A

t-SNARE: target SNARE

VAMP: Vesicle Associated Membrane Protein

v-ATPase: ATPase vésiculaire

VIL: Vesicule IntraLuminale

VLCD: Vesicule Large à Cœur Dense

VS: Vésicule Synaptique

v-SNARE: vesicular SNARE

INTRODUCTION

I. Les neurotoxines botuliques : du botulisme aux applications thérapeutiques

Les toxines botuliques sont synthétisées par des bactéries sous forme d'un complexe multimoléculaire comprenant un composant neuroactif appelé neurotoxine botulique (BoNT). Ce sont les agents biologiques responsables du botulisme humain et animal, maladie se manifestant par une paralysie flasque. Celle-ci résulte d'une perte de fonction des nerfs périphériques contrôlant les muscles au niveau des jonctions neuromusculaires (JNMs). Au sein d'un organisme, les BoNTs sont capables de cibler spécifiquement des neurones du système périphérique pour entraver le mécanisme de libération de neurotransmetteurs. En l'absence de neurotransmetteurs libérés dans la synapse neuromusculaire, le signal d'activation provenant du neurone ne parvient plus au muscle entravant ainsi le déclenchement de la contraction musculaire. Dans le domaine thérapeutique, la capacité des BoNTs à inhiber la neurotransmission est utilisée pour corriger des troubles liés à l'hypercontraction musculaire ou de l'hypersécrétion glandulaire.

1. Découverte du botulisme

a. Une maladie séculaire

i. *Les bactéries à l'origine du botulisme*

Les toxines botuliques à l'origine du botulisme proviennent de bactéries pathogènes du genre *Clostridium* et appartenant à l'espèce nommée *botulinum* (*Clostridium botulinum* ou *C. botulinum*). D'autres souches de *Clostridium*, plus rarement isolées, *Clostridium baratii* (*C. baratii*), *Clostridium butyricum* (*C. butyricum*) ou *Clostridium argentinense* (*C. argentinense*), peuvent également produire certains sérotypes de BoNTs (Bhandari et al., 1997; McCroskey et al., 1986, 1991). *C. botulinum*, est une bactérie anaérobie que l'on retrouve dans les sols et les sédiments aquatiques du monde entier. Comme les autres espèces du genre *Clostridium*, elle se classe dans la catégorie des bactéries gram-positive et sa capacité à sporuler lui permet de résister à des conditions extrêmes. Bien qu'il soit impossible de dater précisément l'apparition du genre *Clostridium* et encore moins celle des

premières toxines botuliques sécrétées, on ne peut exclure que des espèces du genre *Clostridium* aient pu développer certains types de toxines botuliques avant même l'apparition de l'homo sapiens. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances et aux vues de la conservation des cibles des BoNTs à travers le règne animal, il est tout à fait concevable que l'homme ait toujours « cohabité » avec des toxines botuliques présentes dans son environnement (Erbguth, 2004).

ii. Le botulisme à travers les âges

Depuis aussi longtemps que l'homme se préoccupe de conserver de la nourriture, il est probable qu'il ait été significativement exposé au botulisme (Erbguth, 2004). En effet, à travers les âges et selon les cultures, différents modes de préparation et conservation ont été expérimentés pour divers types d'aliments, or il est maintenant avéré que certaines pratiques alimentaires présentent un risque non négligeable d'intoxication par *C. botulinum*. Parmi les préparations ancestrales d'aliments propices au développement de ces bactéries, on peut citer les poissons trop peu séchés ou trop peu fumés, consommés historiquement autour de la mer Baltique, les jambons préparés dans des barriques de saumure en France, ou encore certaines saucisses et boudins manquant de cuisson. Toutefois, bien qu'anciennement le botulisme ait pu faire de nombreuses victimes, les hommes ne faisaient pas forcément le lien entre les morts survenues et un empoisonnement d'origine alimentaire, si bien que les premières investigations et observations détaillées n'apparaissent qu'au début du 19^{ième} siècle. Néanmoins certaines règles alimentaires énoncées dans un passé plus antérieur semblent refléter d'anciennes constatations/connaissances au sujet d'aliments dangereux, dont certains sont évocateurs d'un risque de botulisme. Dans ce sens, l'auteur Louis Smith rapporte dans un ouvrage consacré au botulisme que l'empereur Leo VI de Bysance aurait édicté au 10^{ième} siècle l'interdiction de préparer du boudin noir sous peine de sanctions (Smith, 1977). Par ailleurs, il est tout aussi probable que certains cas de botulisme aient pu être confondus avec d'autres types d'affections paralytiques et décrits de manière erronée dans la vieille littérature médicale. Il est intéressant de remarquer que l'intoxication par *Atropa belladonna* ou Belladone (plante dont la toxicité serait décrite depuis l'antiquité) est responsable d'un syndrome atropinique dont certains symptômes périphériques (mydriases, sécheresse

buccale, nausées, constipation, rétention urinaire, etc.) s'apparentent à ceux du botulisme. Le botulisme ne sera finalement identifié qu'assez tardivement.

b. Observations et avancées du 19^{ième} siècle

A la fin du 18^{ième} siècle, dans un contexte de pauvreté héritée des guerres napoléoniennes, la détérioration des conditions d'hygiène entraîne la multiplication des cas d'empoisonnements alimentaires dans la région de Württemberg en Allemagne. A cette époque, l'ampleur de ce phénomène énigmatique stimule les premières observations détaillées, ainsi que le recensement rigoureux des différentes épidémies. Les connaissances sur la maladie progresseront jusqu'à l'émergence de l'hypothèse causale reliée à la consommation de viande infectée et plus particulièrement à celle de certaines saucisses populaires. Au début du 19^{ième} siècle, le gouvernement royal valide cette hypothèse en reconnaissant publiquement la consommation de boudins fumés comme dangereuse. Dans les années qui suivirent, les universités de médecine et autres départements médicaux du royaume seront mobilisées afin de trouver des solutions. La section médicale du département des affaires internes considéra dans un premier temps que le cyanure d'hydrogène (ou acide prussique) pouvait constituer le « poison des saucisses ». Et parmi les membres de la faculté de médecine de l'université de Tübingen, W.G. Von Ploucquet suspecta davantage un éventuel poison organique d'origine biologique/animal. Dans un second temps et à la demande de J.H.F. Autenrieth, alors éminent professeur de l'université de Tübingen, le gouvernement procédera à la collecte massive des rapports de médecins ayant rencontrés des cas d'empoisonnements alimentaires. De l'étude de ces rapports, Autenrieth dressera une première liste de symptômes de l'empoisonnement aux saucisses (Erbguth, 2004).

En 1815, un jeune poète romantique du nom de Justinus Kerner (**Figure 1**) relate un cas d'empoisonnement alimentaire dans un rapport qui sera adressé au professeur Autenrieth. Ce dernier publiera en 1817 les observations pertinentes de Kerner dans le journal de l'université de Tübingen. Epousant une carrière médicale, J. Kerner poursuivit ces recherches sur « le poison des saucisses » en collectant des informations détaillées auprès de 230 patients sur une période de 25 ans et publia notamment deux ouvrages en 1820 et 1822. Ce pionnier dans l'étude de la maladie réalisa alors la première description précise et complète des symptômes autonomiques, gastro-intestinaux et neuromusculaires

caractérisant le botulisme alimentaire. De plus, il conduisit une série d'expériences chez plusieurs espèces animales (mammifères, oiseaux, grenouilles) en mélangeant des extraits de saucisses contaminées avec du miel pour nourrir ses sujets. Il observa ainsi des effets similaires à ceux observés chez l'homme et alla même jusqu'à expérimenter un épisode de botulisme naissant après avoir pris le risque de tester personnellement ses préparations. Enfin, les connaissances rassemblées par J. Kerner lui firent poser plusieurs hypothèses justes sur l'étiologie et la physiopathologie de « l'empoisonnement aux saucisses » (Erbguth, 2004) : le poison se développe dans les saucisses en conditions anaérobies ; le poison est une substance biologique ; le poison est potentiellement létal à faible dose ; le poison agit sur le système moteur et le système autonome.

Le terme « botulisme », dérivé du mot latin « botulus » qui signifie saucisse, émergera vers 1870 en référence à l'aliment avec lequel la pathologie fut historiquement associée (Torrens, 1998).

c. Identification et caractérisation de l'agent infectieux au 20^{ième} siècle

En 1895, à la suite d'une intoxication survenue dans la ville d'Ellezelles/Hennegau en Belgique, E. Van Ermengen (**Figure 1**) isole pour la première fois une souche de *C. botulinum* à partir d'échantillons de jambon contaminé. Les toxines botuliques produites par cette souche seront ensuite référencées parmi le type B (BoNT/B) (Van Ermengem, 1897; van Ermengem, 1979). Neuf ans après, G. Landmann isola une seconde souche de *C. botulinum* à partir d'une préparation d'haricots incriminée dans une autre épidémie de botulisme survenue à Darmstadt en Allemagne (Landmann, 1904). Quelques années après il sera montré que cette seconde souche produit une autre variante de toxine qui se classe aujourd'hui parmi le type A (BoNT/A) (Sakaguchi, 1982).

En 1910 J. Leuchs fut le premier à montrer une différence d'antigénicité entre les BoNTs issues des souches d'Ellezelles et de Darmstadt : des anticorps générés chez le cheval à partir des toxines de la première souche sont capables de neutraliser ces dernières mais pas les BoNTs provenant de la seconde souche, et réciproquement (Leuchs, 1910). Faisant suite aux travaux de J. Leuchs, G.S Burke (**Figure 1**) analysa en 1919 différentes variantes de BoNTs provenant d'une douzaine de souches en reprenant la même méthodologie: Deux types d'anticorps anti-toxine générés chez le lapin furent testés pour leur capacité à

neutraliser des BoNTs issues de différentes souches une fois injectées chez le cochon d'inde. Cette étude permit de dégager deux types de toxines, définies par l'absence de neutralisations croisées chez l'animal, soient les premiers sérotypes désignés A et B, que l'auteur rapporta en son temps à des souches de type A ou B de *Bacillus Botulinus* (*B.botulinus*, ancien nom de *C. botulinum*) (Burke, 1919). Ces travaux initièrent une classification par sérotype (voir partie 2.b.i) toujours actuelle, pour regrouper les différents types de toxines botuliques des nombreuses souches recensées. Au cours du 20^{ième} siècle, cinq autres sérotypes seront ensuite identifiés : BoNT/C (Bengtson, 1922, 1923), BoNT/D (Meyer and Gunnison, 1929), BoNT/E (Hazen, 1937), BoNT/F (Moller and Scheibel, 1960) et BoNT/G (Giménez and Ciccarelli, 1970).

Les étapes clefs de la caractérisation des toxines botuliques et du botulisme s'étalèrent ensuite sur plusieurs décennies (**Figure 2**) : En 1928, la première purification de BoNT fut réalisée pour une toxine de type A (Snipe and Sommer, 1928). Puis, en 1946, la première forme cristalline a été obtenue, toujours pour la BoNT/A (Lamanna et al., 1946). Il faut attendre encore trois ans pour qu'en 1949 soit mis en évidence l'effet de blocage des BoNTs sur la libération d'acétylcholine, impliquée dans la transmission neuromusculaire (Burgen et al., 1949). Dans les années 50, une nouvelle forme de botulisme, symptomatiquement semblable mais causé par blessure et non pas par empoisonnement alimentaire, fut mis en lumière. Enfin, une autre forme, le botulisme infantile, lié à la production endogène de toxines après germination de spores de *Clostridium botulinum* dans l'intestin (toxi-infection), ne sera reconnue qu'à partir des années 70.

Concernant l'utilisation thérapeutique de la toxine chez l'homme, les premiers travaux ont été initiés en ophtalmologie par Alan B. Scott (**Figure 1**) et Edward J. Schantz (Zhang et al., 2010). Ainsi, après des tests préliminaires effectués chez le primate avec la toxine botulique de type A en 1973, Scott utilisa cette même toxine sur l'homme en 1980, dans le traitement du strabisme de type « croisement des yeux » ou le « clignement incontrôlable » (Scott, 1981). Plus tard, cette toxine plus connue sous le nom commercial de Botox® sera approuvée par l'agence Américaine du médicament (FDA) en décembre 1989 pour le traitement de différents troubles musculaires.

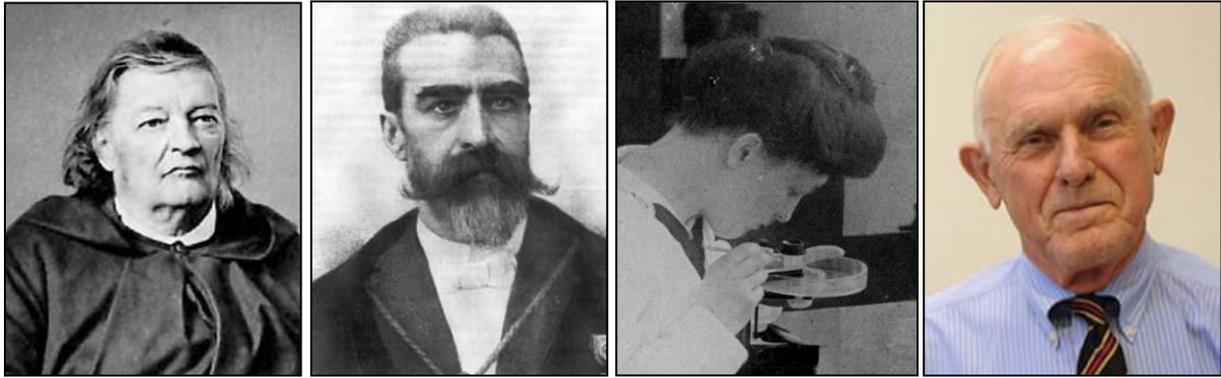


Figure 1 : Quelques «grands noms» de la recherche sur le botulisme. De gauche à droite : Justinus Kerner, Emile P. Van Ermengen, Georgina S. Burke et Alan B. Scott.

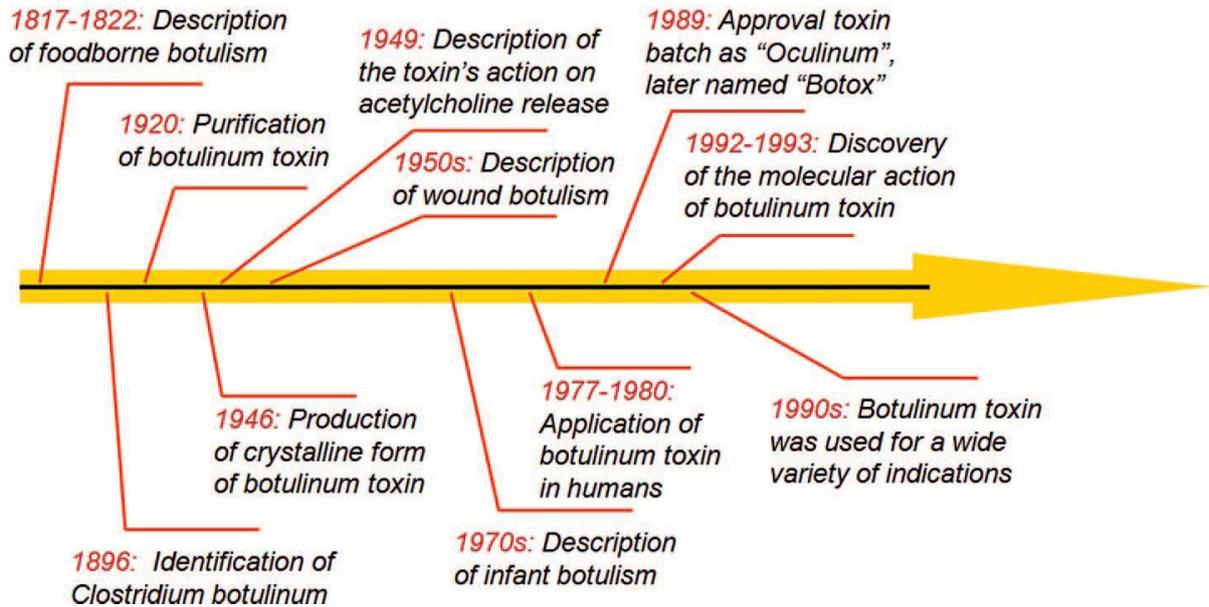


Figure 2 : Chronologie des étapes clés de la recherche sur le botulisme au 19^{ième} et 20^{ième} siècle. Les principales avancées sont positionnées le long d'un axe temporel (flèche) borné par des dates (d'après Zhang et al. 2010).

En parallèle, la première séquence complète d'ADN codant de BoNT fut déchiffrée en 1990 pour la BoNT/A (Binz et al., 1990). Et en seulement quelques années, les séquences des autres sérotypes ont été déterminées (Rummel, 2015). Ces données aboutiront à la définition des sous-types de BoNTs, détaillant davantage la diversité des BoNTs au sein de chacun des sérotypes.

2. Structure et diversité des toxines botuliques

a. Structure moléculaire des toxines botuliques

Les toxines botuliques sont synthétisées par les bactéries sous forme d'un complexe multimoléculaire comprenant un composant neuroactif, la neurotoxine botulique (BoNT), et des protéines associées non toxiques (NAPs). La neurotoxine est une chaîne peptidique monocaténaire de 150 kDa qui devient active après une étape de clivage post-traductionnelle, opérée par des protéases provenant de la bactérie sécrétrice pour les souches dites protéolytiques ou du milieu extérieur pour les souches dites non-protéolytiques. Les BoNTs présentent alors deux sous unités, soit une chaîne légère (LC) de 50kDa et une chaîne lourde (HC) de 100 kDa, lesquelles demeurent associées par un pont disulfure et des liaisons non covalentes (Rossetto et al., 2013) (**Figure 3**). Les deux chaînes abritent des domaines fonctionnellement indépendants, intervenant à différentes étapes du processus d'intoxication cellulaire. La LC possède une activité enzymatique responsable d'une dégradation ciblée de protéines cellulaires qui se traduit par une inhibition de la libération de neurotransmetteurs dans les neurones intoxiqués. En effet, la LC est une endopeptidase à zinc clivant spécifiquement des protéines du complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor), indispensables à la fusion des vésicules synaptiques (VSs) avec la membrane neuronale et la libération de leur contenu. La HC comprend une première partie N-terminale (H_N) de 50 kDa impliquée dans le processus de translocation cytoplasmique de la toxine, ainsi qu'une seconde partie C-terminale (H_C) de 50 kDa constituant le domaine de liaison spécifique aux récepteurs neuronaux (**Figure 4**). Au sein de la partie H_C on distingue encore les sous-domaines H_{CN} et H_{CC} représentant respectivement deux portions N et C-terminales de 25 kDa chacune. Alors que la fonction du domaine H_{CN} n'a pas encore été clairement établie, le domaine H_{CC} abrite

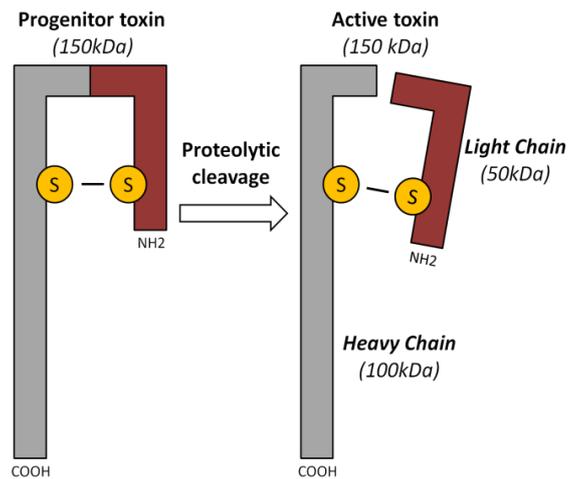


Figure 3 : Schéma de l'activation des précurseurs des BoNTs par clivage protéolytique. La forme monocaténaire inactive de la BoNT (à gauche) subit un clivage protéolytique pour donner la forme active de la toxine. Cette forme active comporte deux parties : la chaîne lourde (Heavy Chain en gris) de 100kDa et la chaîne légère (Light Chain en rouge foncé) de 50kDa. Les deux parties HC et LC de la BoNT active demeurent reliées par un pont disulfure représenté par un trait liant deux atomes de soufre (cercles affichant un « S »).

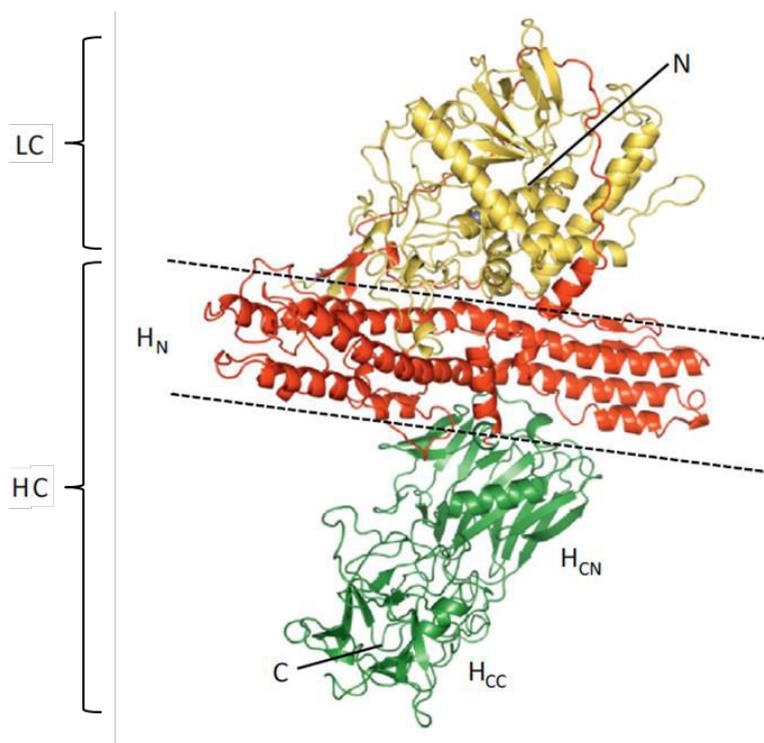


Figure 4 : Organisation des différents domaines de la BoNT/A1. La chaîne légère de 50 kDa (LC, en jaune) représente la partie active de la toxine, laquelle s'apparente à une endopeptidase à zinc. La chaîne lourde de 100 kDa (HC) comprend un domaine N-terminal de 50 kDa (H_N , en orange) impliquée dans la translocation de la LC dans le cytoplasme, ainsi qu'une partie C-terminale (H_C , en vert). La partie H_C est elle-même subdivisée en deux domaines H_{CN} et H_{CC} . La partie H_{CC} est notamment impliquée dans la liaison de la toxine sur les récepteurs neuronaux (d'après Kammerer & Benoit, 2014).

les sites de liaisons pour les récepteurs des BoNTs (Rummel et al., 2011).

De par la présence de ces trois domaines structuraux fonctionnels, comprenant une composante de liaison, de translocation et d'activité catalytique, les BoNTs, comme la toxine tétanique, diphtérique ou d'autres toxines clostridiales entériques, se classent dans le groupe des toxines bactériennes dites AB à mode d'action intra cellulaire (Ménétreay et al., 2005).

b. Diversité des toxines botuliques

Les différences de propriétés antigéniques des BoNTs constituent la base d'une classification historique par sérotypes, dont les limites ont conduit à l'identification de toxines dites mosaïques, hybrides naturels entre deux sérotypes. Enfin, parmi certains sérotypes, de nombreux sous-types ont pu être définis selon des critères génétiques pouvant corrélérer avec des différences fonctionnelles.

i. Classification par sérotype

A ce jour, sept sérotypes de BoNTs désignés par les lettres A à G (BoNT/A – G) ont été définis sur la base de leurs propriétés antigéniques.

Dès la caractérisation des premiers sérotypes au début du 20^{ième} siècle, des différences de toxicité furent décrites entre les deux premiers sérotypes identifiés, les souches du type A produisant des toxines plus puissantes comparées aux toxines des souches B (Burke, 1919).

Parmi les sérotypes identifiés, seules les BoNT/A, -B, -E et exceptionnellement la BoNT/F affectent l'homme de manière non exclusive (Zhang et al., 2010). Les autres sérotypes sont essentiellement impliqués dans le botulisme animal : la BoNT/C, qui est notamment impliquée dans le botulisme aviaire, est également associée aux épidémies de botulisme des élevages bovins, comme la BoNT/D (Souillard et al., 2015). Par contre, à ce jour aucun cas de botulisme chez l'homme ou l'animal n'a encore été relié à la BoNT/G.

Enfin, l'existence d'un huitième sérotype (BoNT/H) avait été récemment proposée pour une des deux toxines sécrétées par la souche IBCA 10-7060, isolée à partir d'un patient atteint de botulisme infantile. Cependant des travaux complémentaires portant sur la séquence de ce nouveau type de toxine permirent ultérieurement de la classer dans la catégorie des toxines mosaïques du sérotype F.

La classification par sérotype ne rend pas pleinement compte de la diversité des BoNTs, observée au niveau de leur toxicité, des récepteurs cellulaires reconnus ou encore des cibles intracellulaires affectées.

ii. Toxines Mosaïques

Pour certaines BoNTs, la détermination du sérotype s'est avérée relativement délicate en raison de propriétés antigéniques particulières. Ainsi, il a été montré que les anticorps générés contre la chaîne lourde de la BoNT/D provenant d'une souche sud-africaine (BoNT/D-SA), détectaient plus efficacement la BoNT/C provenant de la souche Stockholm (BoNT/C-S) que la BoNT/D issue de la souche 1873 (BoNT/D-1873). De plus, ces mêmes anticorps se révélèrent peu efficaces dans la détection de la BoNT/C sécrétée par la souche 6813 (BoNT/C-6813) (Rummel, 2015). En contraste, des anticorps dirigés contre la partie LC de la BoNT/D-SA détectaient aussi bien la BoNT/D-SA que la BoNT/D-1873, sans toutefois détecter aucune des deux BoNT/C (Moriishi et al., 1989). Ces observations suggérant un échange de domaines HC entre certaines souches de BoNT/C et BoNT/D ont conduit par la suite à l'analyse de leur séquence ADN. Le clonage et séquençage moléculaire ont alors effectivement mis en évidence qu'au sein des séquences codantes des BoNT/D-SA et BoNT/C-6813, les parties C-terminales de HC s'apparentaient au sérotype opposé : la séquence du domaine C-terminal (945-1285) de BoNT/D-SA partage 74% d'identité avec la BoNT/C1 (Moriishi et al., 1996a) et celle du domaine C-terminal (902-1280) de BoNT/C-6813 présente 95% de similarité avec la BoNT/D (Moriishi et al., 1996b). Sur la base de ces résultats, les toxines BoNT/D-SA et BoNT/C-6813, furent respectivement rebaptisées BoNT/DC et BoNT/CD et furent les premiers exemples décrits des toxines mosaïques.

Plus récemment, un autre type de toxine mosaïque a été identifié, soit la BoNT/FA initialement appelée BoNT/H, dont la séquence du domaine LC présente une forte homologie avec celui de la BoNT/F5 et dont le domaine H_C s'apparente à celui de la BoNT/A (Gonzalez-Escalona et al., 2014). Cependant, le domaine H_N de BoNT/FA possède une séquence non homologue aux autres sérotypes (Dover et al., 2014).

iii. Sous-types de toxines botuliques

L'analyse génétique des BoNTs/A-G a permis de constater des différences importantes (évaluées entre 30 et 70%) de séquences en acides aminés entre les différents sérotypes (Williamson et al., 2016). Toujours sur des critères de séquences, les différents sérotypes de BoNTs ont ensuite été subdivisés en sous-types. Initialement, il a été montré pour le sérotype A que certaines toxines présentaient des différences dans leur séquence primaire par rapport à une BoNT/A prise pour référence, soit la souche 62A impliquée dans le botulisme alimentaire. Ainsi, la BoNT/A issue de la souche Kyoto-F, qui a été découverte dans un cas de botulisme infantile, comporte un peu plus de 10% d'acides aminés différents par rapport à la BoNT/A de la souche 62A (Willems et al., 1993; Rummel, 2015). Depuis cette étude, six autres sous-types de BoNT/A ont été identifiés et pour chacun d'eux a été assigné un numéro de 1 à 8 (BoNT/A1-A8) (Kull et al., 2015). Sur ce modèle, les sous-types des autres sérotypes ont été désignés par des numéros ajoutés à la suite de la lettre indicative du sérotype. Initialement, les sous-types de BoNTs ont été définis sur la base de différences observées dans les séquences primaires, selon un pourcentage de différence de composition en acides aminés d'au moins 2,5% (Smith et al., 2005). Les pourcentages de variabilité de séquence entre les différents sous-types sont désormais considérés pour un seuil plus bas, soit moins de 1% de différence, et peuvent aller jusqu'à plus de 30% : Les sous-types BoNT/A1-8 présentent un taux de variation de séquence compris entre 2,9% et 15,6% , les BoNT/B1-9 entre 1,6% et 7,3% , les BoNT/E1-11 entre 0,9% et 10,9% et les BoNT/F1-7 entre 3,0% et 36,2% (Rummel, 2015) (**Figure 5**). On dénombre aujourd'hui plus de 40 variants génétiques de BoNTs.

Outre les variations observées dans les séquences, les sous-types de BoNTs peuvent se différencier au niveau fonctionnel. Avant même que les séquences ne soient résolues et comparées, il avait été constaté que des BoNTs appartenant à un même sérotype mais provenant de souches distinctes pouvaient montrer des différences d'antigénicité. En effet, les anticorps générés contre le fragment HC de la BoNT/B1 issue de la souche Okra ne reconnaissent pas aussi efficacement la BoNT/B issue de la souche QC (Kozaki et al., 1977). De façon analogue, des anticorps produits contre la BoNT/A1 ne reconnaissent pas de la même manière la BoNT/A1 et la BoNT/A2 (Kozaki et al., 1995). Concernant les propriétés de liaison, des expériences similaires appliquées au sérotype B ont montré que la BoNT/B2 de la

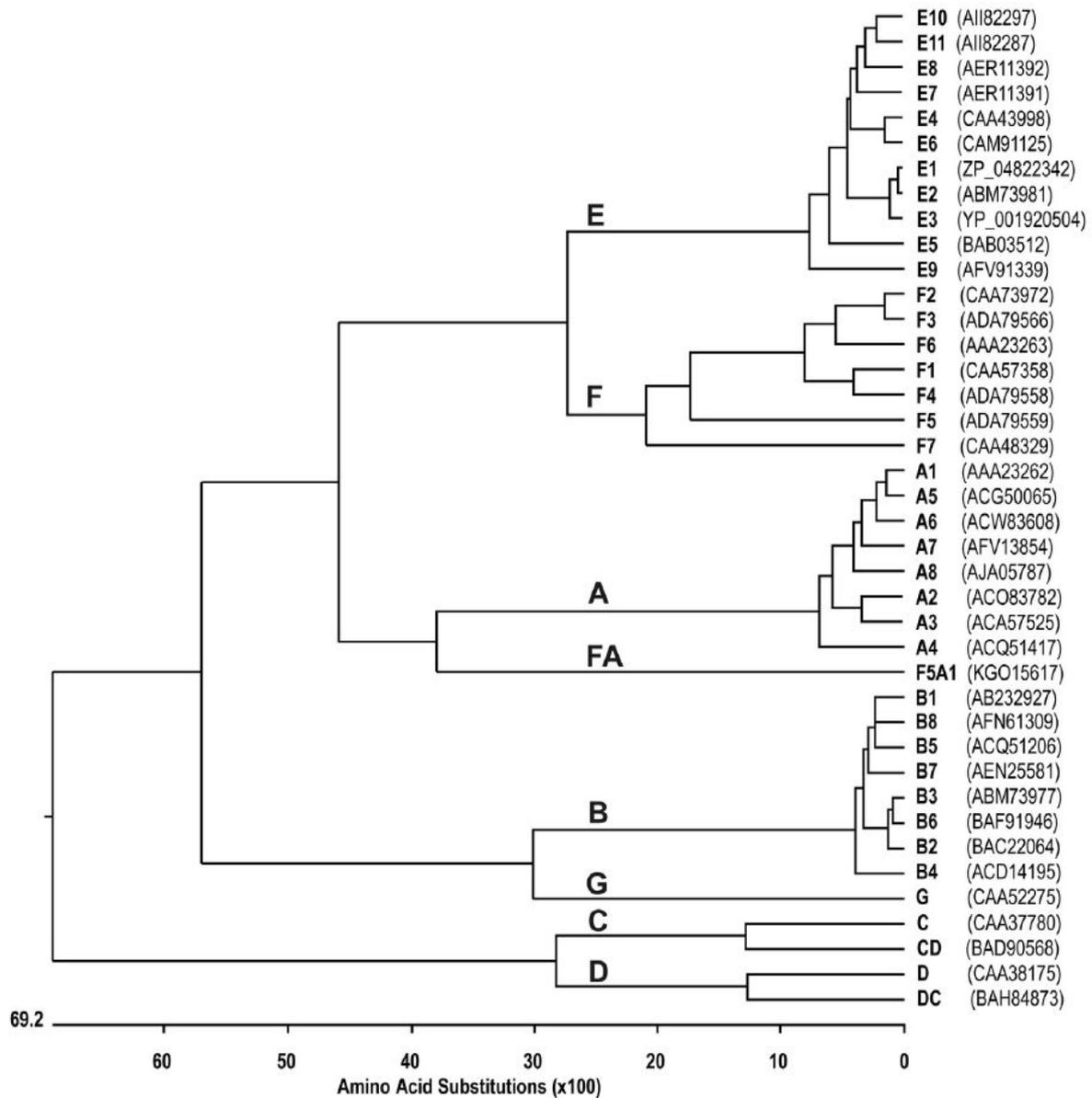


Figure 5 : Arbre phylogénétique des variants de BoNTs : sérotypes, sous-types et toxines mosaïques. La majorité des variants de BoNTs notés à l'extrémité des branches de l'arbre, constituent des sous-types désignés par des numéros, lesquels sont accolés à une lettre indiquant l'appartenance à un sérotype parmi les sept répertoriés (A à G). Les toxines mosaïques CD et DC sont aussi indiquées et rangées respectivement parmi les sérotypes C et D. L'axe horizontal (en bas) indique, de la droite vers la gauche, le pourcentage croissant de différence de composition en acides aminés (Amino Acid) entre les différents variants de BoNTs positionnées dans l'arbre. Pour chaque variant de BoNT, le nom de code de la souche bactérienne sécrétrice est indiqué entre parenthèses (sur la droite ; d'après Rummel 2015).

souche 111 se liait au synaptosomes avec une plus forte affinité comparé à la BoNT/B1 de la souche Okra (Kozaki et al., 1998a). Outre les propriétés de liaison, l'activité catalytique ainsi que d'autres propriétés pharmacologiques telles que la durée d'action, présentent aussi des disparités entre les sous-types de BoNTs, notamment pour le sérotype A (Kull et al., 2015; Pellett et al., 2015). Enfin, la définition de sous-types de BoNTs, basée sur des différences de séquences primaires (seuil de pourcentage arbitraire) ou de propriétés fonctionnelles, fait l'objet de débats dans le domaine (Rummel, 2015).

iv. Classification des toxines botuliques par groupes bactériens

Les souches de *C. botulinum* sont très hétérogènes, notamment d'après leurs caractères biochimiques et génétiques. On décrit aujourd'hui six groupes distincts de bactéries produisant des toxines botuliques (**Tableau 1**) dans lesquels se rangent plusieurs types de souches de *C. botulinum* (groupes I, II, III), ainsi que les espèces *C. argentinense* (groupe IV), *C. baratii* (groupe V) et *C. butyricum* (groupe VI) (Williamson et al., 2016).

Ces groupes rassemblent respectivement des souches dites protéolytiques et non-protéolytiques, en fonction de leur capacité à cliver la forme précurseur monocaténaire (**Figure 3**) ainsi que des souches non-toxinogènes (**Tableau 1**).

v. Variabilité génétique des toxines botuliques

L'existence de ces nombreux variants génétiques s'explique autant par la plasticité que par la mobilité des gènes codant pour les BoNTs (Smith et al., 2015). En effet, de nombreux événements de recombinaison génétique ont été décrits pour différentes BoNTs (Williamson et al., 2016). Par exemple, l'analyse des séquences primaires des BoNT/A1-3 a révélé que le sous-type A2 correspond à une toxine chimérique se composant d'une LC dont la séquence partage un fort niveau d'identité avec celle de la BoNT/A1, et d'une HC dont la séquence est très proche de celle de la BoNT/A3 (Arndt et al., 2006). De façon similaire, la BoNT/F6 correspond à une chimère entre la BoNT/F1 (97,7% d'homologie de séquence pour sa partie initiale d'environ 1300 nucléotides) et la BoNT/F2 (environ 97% d'homologie de séquence pour la partie restante) (Smith et al., 2015). Seulement, du fait que les BoNT/F1 et F2 soient uniquement produites par les bactéries clostridiales du groupe I (**Tableau 1**), la production exclusive de BoNT/F6 par les bactéries clostridiales du groupe II (**Tableau 1**) démontre un

Pathogenic species	<i>Clostridium botulinum</i>				<i>Clostridium baratii</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
Sero-/subtypes	A1-8 B1-3/5-9 F1-5	B4 E1-3/6-11 F6	C D CD, DC	G	F7	E4/5
Bont localisation	Chromosome, plasmid	Chromosome, plasmid	Bacteriophage, plasmid	Chromosome	Chromosome	Chromosome
Non-path. species	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. sub-terminale</i>		<i>C. beijerinckii</i>
Proteolytic	+	-	+	+	-	-

Tableau 1 : Classification des *Clostridium* produisant des toxines botuliques (d'après Rummel, 2015)

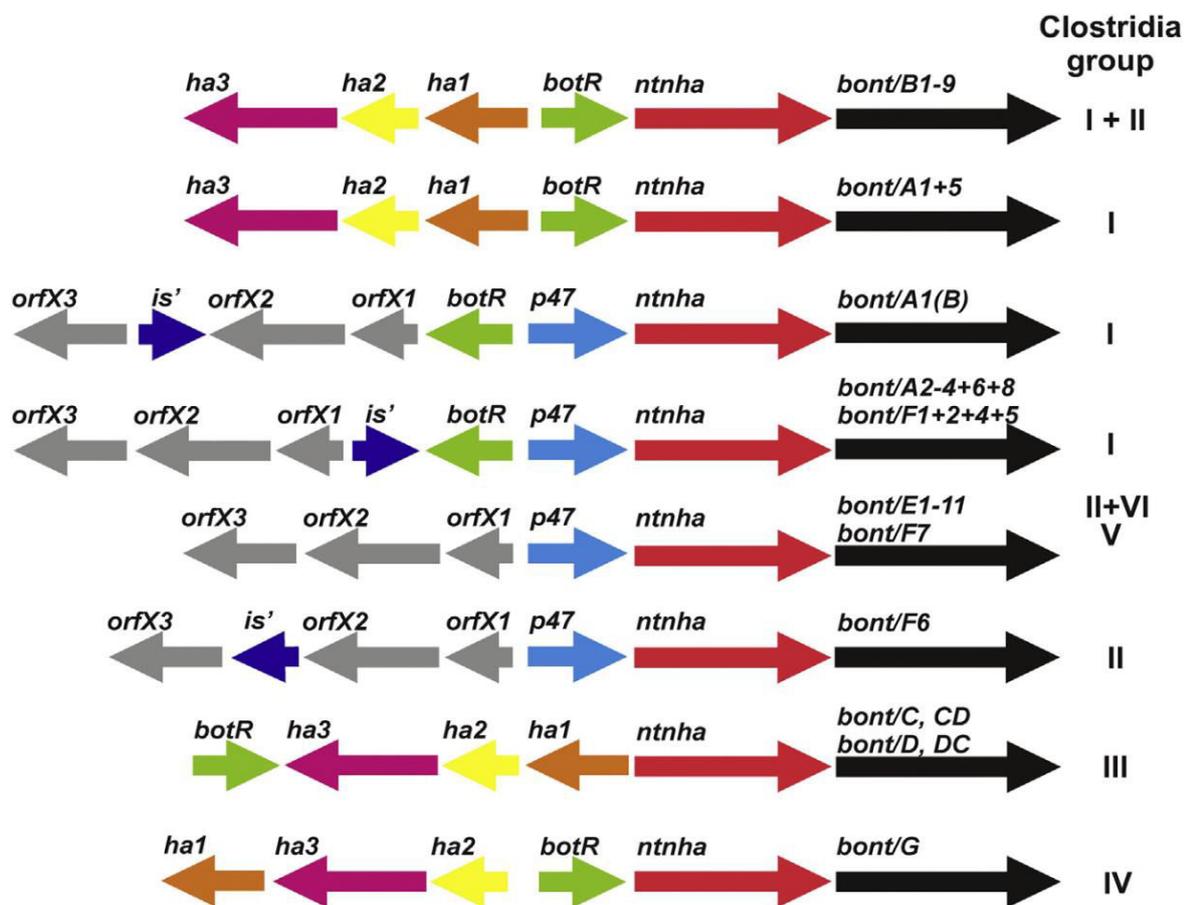


Figure 6 : Organisation des loci botuliques. Deux types de clusters sont distingués : les ha^+ clusters (deux premières et deux dernières lignes) et les $orfX^+$ clusters (quatre lignes centrales). Les ha^+ clusters codent pour les BoNTs, les NTNH et les protéines du complexe HA (HA1, HA2, HA3 aussi nommées HA17, HA33 et HA70). Les $orfX^+$ clusters présentent une série de trois séquences codantes (*orfX1*, *orfX2*, *orfX3* pour « open reading frame » 1, 2 ou 3) dont les protéines putatives correspondantes ne sont pas encore clairement identifiées (d'après Rummel, 2015).

transfert des gènes codant pour les BoNTs entre des souches distinctes de *C. botulinum* s'additionnant aux événements de recombinaison. Les gènes de BoNTs peuvent ainsi être transférés horizontalement, c'est-à-dire sans lien de descendance entre les souches bactériennes, et sont d'ailleurs aussi bien retrouvés dans les chromosomes bactériens que dans des structures plus mobiles que sont les plasmides ou les phages (**Tableau 1**). Dans le cas des bactéries clostridiales, les séquences codant pour les BoNTs sont très mobiles et les transferts horizontaux peuvent même intervenir entre des espèces différentes (Skarin et al., 2011). Aussi, alors que la majorité des souches produisent un seul type de toxine, certaines souches clostridiales bivalentes sont capables de produire deux types de BoNTs en proportions différentes. Par exemple, la souche nouvellement isolée CDC 1436, capable de produire à la fois le sous-type A2 de manière prédominante et le sous-type B5 de manière minoritaire, est désignée comme une souche de type BoNT/A2b5 (Smith et al., 2015). Au niveau de la nomenclature, le sous-type minoritaire est systématiquement indiqué en minuscule et placé en seconde position derrière le sous-type majoritaire indiqué en majuscule.

c. Organisation génomique des toxines botuliques et protéines associées

i. *Organisation des loci botuliques*

Dans la bactérie, les toxines botuliques sont produites en association avec des protéines non toxiques (NAPs) pour former des complexes botuliques de tailles variables selon le sérotype ou le sous-type considéré. Les gènes codant pour les BoNTs (*bont*) sont constitués d'environ 3800 paires de bases et sont intégrés dans des clusters de gènes représentant entre 9000 et 13000 paires de bases, codant pour les NAPs et des éléments régulateurs. Ces clusters sont souvent bordés par des transposases, hélicases ou séquences d'insertion. Ce sont d'ailleurs ces éléments génétiques mobiles qui sont responsables de la fréquence des échanges horizontaux de fragments d'ADN et de la distribution des gènes entre chromosome et plasmides (Hill and Smith, 2013; Rummel, 2015).

Deux types de NAPs sont codés dans ces clusters de gènes : une protéine de 139 kDa que l'on retrouve systématiquement, appelée Non Toxique Non Hemagglutinine (NTNH), et un trio de protéines hémagglutinantes (HA) exprimé seulement dans certains loci botuliques. Ces protéines que l'on retrouve notamment associées à la BoNT/B sont désignées HA17,

HA33 et HA70 en référence à leur poids moléculaire respectif. Pour d'autres loci botuliques, les séquences des protéines HA sont remplacées par des séquences potentiellement codantes non déterminées (OrfX ; pour Open reading frame X) dont les protéines correspondantes n'ont pas encore été caractérisées.

Les loci botuliques sont tous organisés en duo d'opérons polycistroniques bi-directionnels, l'un comprenant les gènes codant pour NTN_H et la BoNT et l'autre les gènes des protéines HA ou les séquences OrfX (Connan et al., 2013) (**Figure 6**). Et à l'exception de la BoNT/A1, chaque variant génétique de BoNT est exclusivement associé à un seul type de cluster. L'agencement des gènes à l'intérieur de ces clusters varie selon les souches et ce notamment en raison de la présence ou non d'une séquence d'insertion (is'), du gène de la protéine p47 (*p47*), ou du gène régulateur (*BotR*) codant pour le facteur sigma (*p21*) régulant la transcription des gènes *ntnha* et *bont* codant pour les protéines NTN_H et BoNT (**Figure 6**).

ii. Structure des complexes botuliques

Selon le type de cluster de gènes, une BoNT peut être associée à un complexe botulique de taille variable. Les BoNT/A1, A5, B(1-9), C, D et G codées dans les clusters de type HA sont associées à des complexes de grande taille (L-PTC) d'environ 760 kDa. Par contre, les BoNT/E(1-11), F(1-7), A(1-4), A6 et A8 codées dans des clusters OrfX sont associées à des complexes plus petits (M-PTC) d'environ 300 kDa (Rummel, 2015). La différence de taille entre les L-PTCs et les M-PTCs est essentiellement due à la présence ou absence des protéines HA (**Figure 7**). Malgré une faible homologie de séquences primaires entre les deux partenaires, les protéines NTN_H décrivent une structure tertiaire très similaire à celle des BoNTs (Matsui et al., 2014). En effet, pour la NTN_H associée à la BoNT/A (NTN_H/A), on retrouve globalement les mêmes domaines structuraux, soit les domaines nommés nLC, nH_N et nH_C équivalents respectifs des domaines LC, H_N et H_C de BoNT/A. Du fait de la similarité des deux éléments, la structure globale du M-PTC évoque une « poignée de main » (**Figure 7**). Toutefois, les acides aminés déterminants pour les propriétés catalytiques et de liaison des BoNTs ne sont pas conservés dans les protéines NTN_H, qui ne présentent alors aucune toxicité. Les L-PTCs sont des hétéromultimères à quatorze sous-unités comprenant la molécule de BoNT, la protéine NTN_H ainsi qu'un complexe dodécamérique formé par trois exemplaires de HA70, trois de HA17 et enfin six HA33.

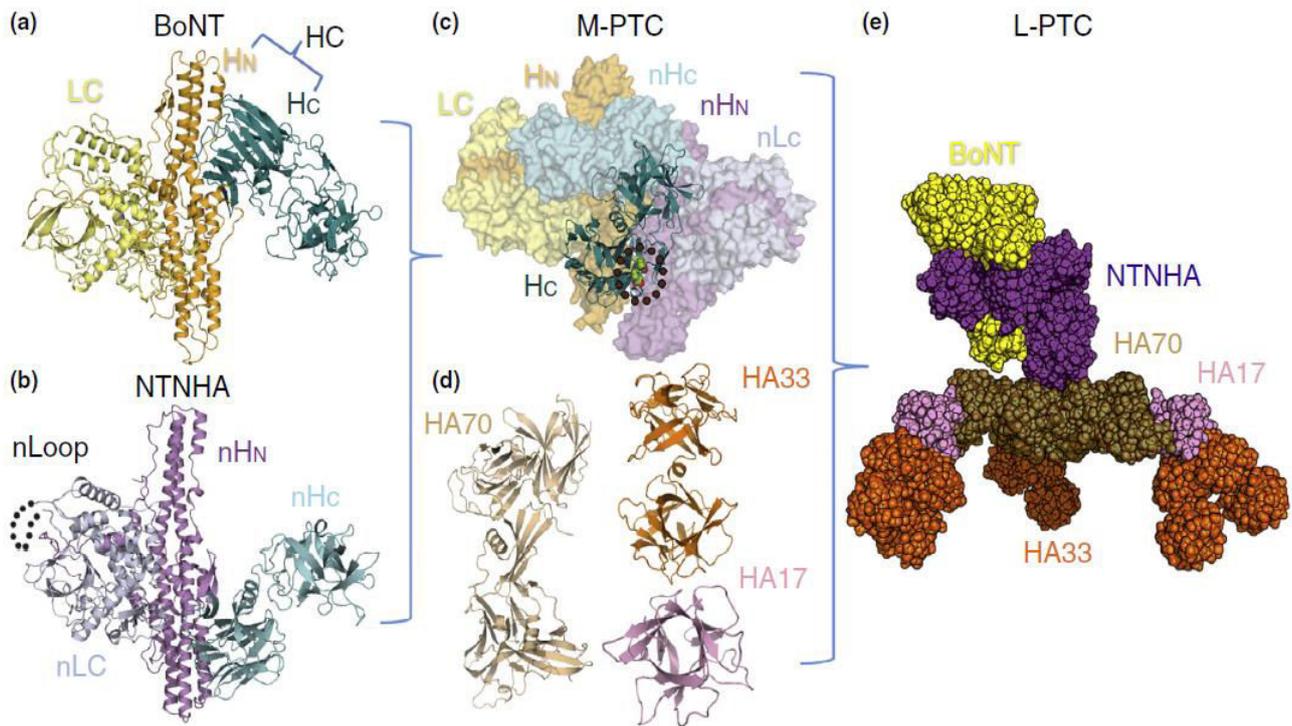


Figure 7 : Assemblage macromoléculaire d'un L-PTC. (a) La BoNT se compose d'une partie LC N-terminale (jaune), d'une partie H_N (orange) et d'une partie H_C (bleu canard) (PDB : 3BTA). (b) NTNHA décrit une organisation de ses domaines très similaire à celle de la BoNT avec les domaines nLC (bleu de gris), n H_N (violet) et n H_C (bleu cyan). Le domaine boucle de NTHA (nLoop, en pointillés) est proposée comme le domaine d'interaction principal avec les protéines du complexe HA (PDB : 3VOA). (c) L'assemblage et le verrouillage du M-PTC est régulé par le pH de l'environnement, et deux résidus senseurs de pH ont été identifiés pour la BoNT/A (cercle de points verts). (d-e) Le M-PTC (BoNT en jaune, NTNHA en violet) s'assemble ensuite avec un complexe HA formé par trois protéines HA70 (sable ; PDB : 4LO4), trois HA17 (rose), et six HA33 (orange ; PDB :4LO0) pour former un complexe bimodulaire, le L-PTC (d'après Lam & Jin 2015).

iii. Fonction des NAPs

Le botulisme étant principalement causé par intoxication alimentaire, les BoNTs doivent le plus souvent emprunter une des voies les plus hostiles de l'organisme, le tractus gastro-intestinal, avant d'atteindre la circulation générale. L'abondance de protéases couplée à une acidité importante ($\text{pH} < 3$) font de l'environnement stomacal une étape périlleuse pour l'intégrité de la neurotoxine.

Suite à la phase d'ingestion, les NAPs des complexes botuliques, qui sont très stables à pH acide, jouent un double rôle à la fois dans la protection et dans la délivrance des BoNTs à l'intérieur d'un organisme. Les NTNH assurent un rôle de protection des BoNTs alors que les HA facilitent la traversée de la barrière intestinale des complexes L-PTCs.

Dès la fin des années 70, les capacités de protection conférées par les protéines NTNH ont été rapportées pour plusieurs sérotypes de BoNTs. Les valeurs de dose létale 50 déterminées après administration orale chez la souris, ont été évaluées comme étant entre 10 et 20 fois inférieures dans le cas des M-PTCs par rapport aux BoNTs (Ohishi et al., 1977; Sakaguchi, 1982). La protéine NTNH protège la BoNT/A de divers processus de dégradation en recouvrant essentiellement sa partie H_C domaine qui est très sensible aux phénomènes de clivage protéolytique (Shone et al., 1985; Chen et al., 1997).

Outre l'importance du M-PTC dans la protection de la BoNT, on a attribué un rôle aux protéines HA pour le franchissement de la barrière intestinale. Les protéines HA se lient à des récepteurs de type hydrates de carbones à la surface des cellules intestinales. Pour cela, les complexes HA des L-PTCs de BoNT/A ou BoNT/B disposent de 9 sites de liaisons aux glycannes répartis sur les sous-unités HA33 et HA70 (**Figure 8**). De plus, il a été montré que les sites de liaisons portés par les sous-unités HA33 présentent un certain degré de flexibilité du fait de leur localisation aux extrémités des branches du triskèle que forme le complexe HA, ce qui suggère une bonne adaptabilité du L-PTCs pour se lier à l'épithélium intestinal. L'importance de ces complexes HA et de leur association aux hydrates de carbone a été validée par des expériences *in vivo*. Ainsi, l'administration de récepteurs aux hydrates de carbone tels que l'IPTG rallonge la survie des souris ayant ingéré une dose létale de BoNT/A (Lee et al., 2013). De plus, il a été rapporté qu'un L-PTC/A mutant rendu incapable de lier les glycannes présente une toxicité orale fortement réduite (Lee et al., 2014).

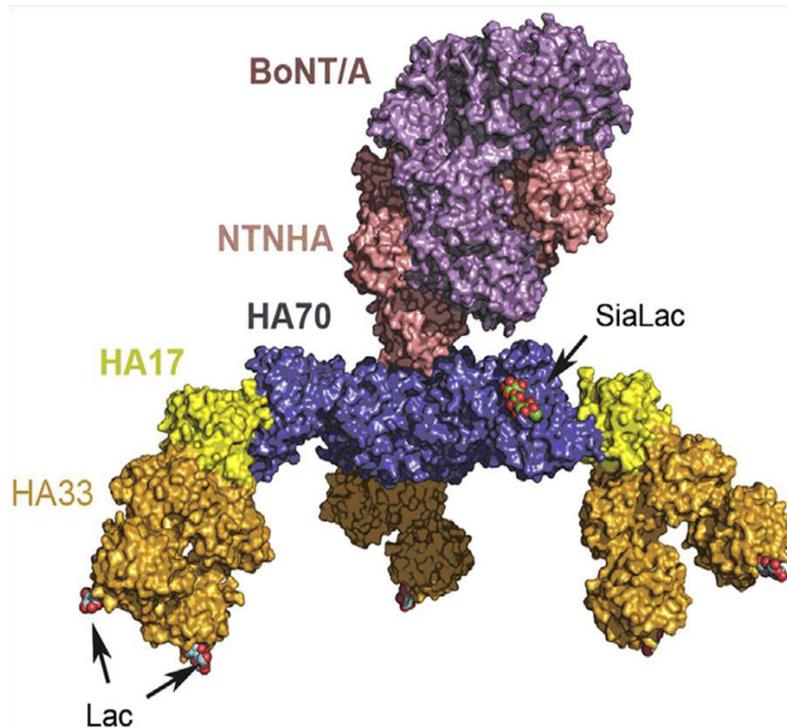


Figure 8 : Structure moléculaire du L-PTC/A et interactions avec des hydrates de carbones. Le M-PTC/A comprenant la BoNT/A et NTNHA-A est assemblé sur un trépied formé par le complexe HA. Chaque protéine HA70 peut lier une molécule de sialyllactose (SiaLac) via un site spécifique reconnaissant l'acide sialique et chaque protéine HA33 peut lier deux molécules de lactose (Lac) via deux sites spécifiques reconnaissant le galactose (d'après Lee et al. 2014).

Les cellules épithéliales intestinales sont étroitement liées entre elles et constituent une barrière physique via des jonctions serrées et d'autres interactions en trans de protéines d'adhérence parmi lesquelles figurent les E-cadhérines. Il a été mis en évidence que la liaison des HA aux E-cadhérines localisées dans les régions baso-latérales des entérocytes, crée des brèches dans les jonctions de l'épithélium favorisant la pénétration des BoNTs par une voie para-cellulaire (Sugawara et al., 2010).

Le mécanisme du passage des toxines botuliques au travers de la barrière intestinale reste à ce jour assez méconnu et se produit par transcytose et/ou par une voie para-cellulaire impliquant les protéines HA (Couesnon et al., 2008; Connan et al., 2016). Cependant, d'autres données montrent clairement que la présence de NAPs associées aux BoNTs n'influence pas le franchissement de la barrière intestinale (Maksymowych et al., 1999; Al-Saleem et al., 2012). Par ailleurs, certaines BoNTs comme la BoNT/E ou la BoNT/F, sont pleinement toxiques après ingestion alors qu'elles sont dépourvues de protéines HA.

3. Mécanisme d'action des neurotoxines botuliques

Quel que soit leur voie d'entrée dans l'organisme hôte, les BoNTs décrivent un mécanisme d'action similaire. Suite à leur absorption, elles atteignent la circulation générale puis interagissent avec des récepteurs spécifiques localisés dans les terminaisons nerveuses des neurones cholinergiques du système nerveux périphérique. Après leur internalisation, elles exercent leur activité catalytique qui affecte le cycle des VSs aboutissant à une paralysie musculaire réversible.

a. Transmission synaptique

i. Principe et vue d'ensemble

La transmission synaptique ou neurotransmission est le processus par lequel un signal provenant d'un neurone est transmis à son voisinage, en l'occurrence un second neurone ou une cellule musculaire. L'interface retrouvée classiquement entre deux neurones ou un neurone et une cellule musculaire se définit comme une synapse chimique (ici simplifiée par le terme unique de synapse) et l'espace restreint les séparant est appelé fente synaptique.

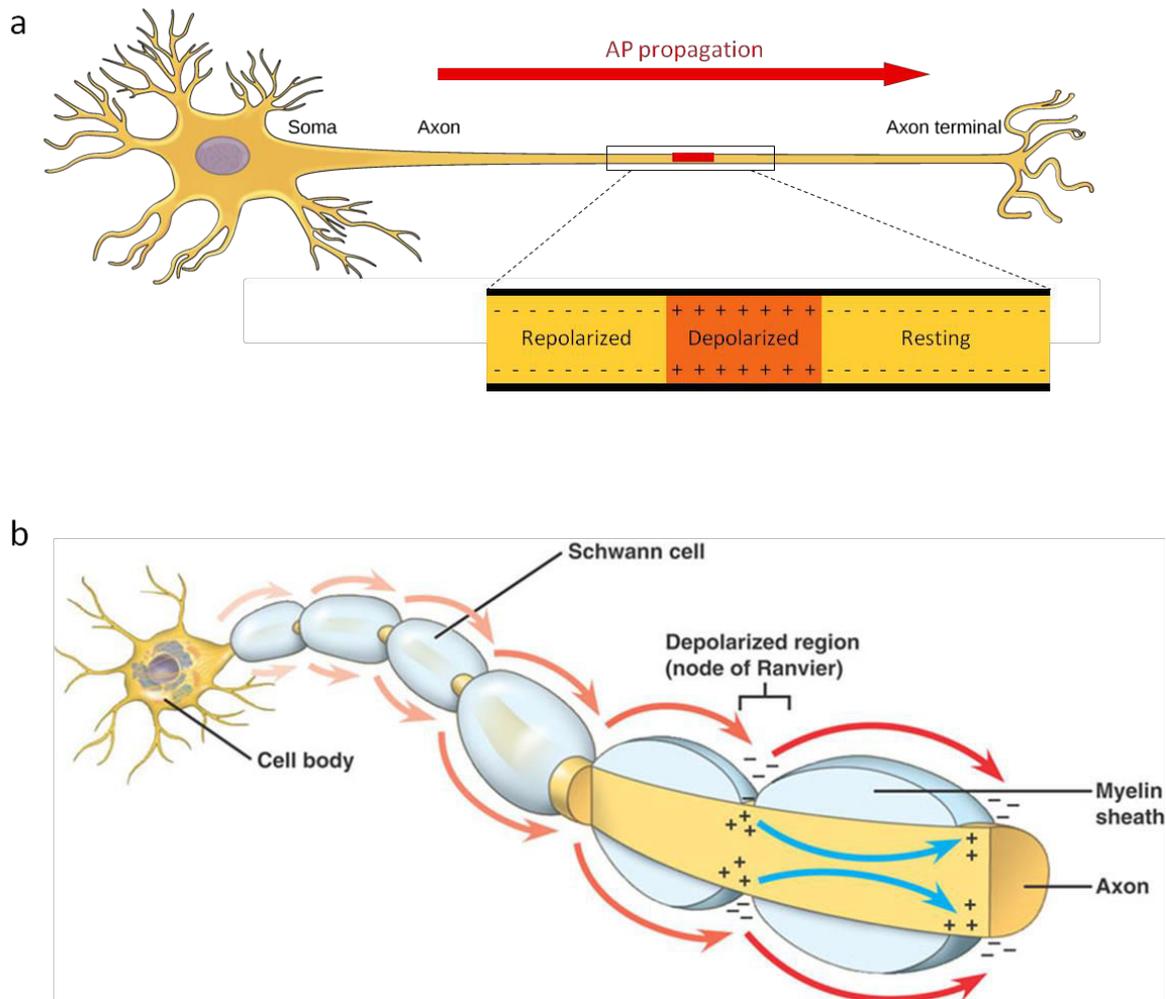


Figure 9 : Schéma illustrant la propagation du potentiel d'action (PA) dans les neurones. (a) Classiquement, les PAs (fenêtre rouge) sont propagés depuis le segment initial de l'axone vers les terminaisons axonales. Le long de l'axone le potentiel d'action se traduit par une dépolarisation membranaire transitoire. En effet, la répartition des charges électriques (charges positives du côté extracellulaire et négatives du côté intracellulaire en situation de repos) se trouve ainsi inversée (encadré). (b) Dans la majorité des axones, des segments myélinisés aux propriétés isolantes limite les déperditions transversales de courants et favorise ainsi leur propagation longitudinale. La présence de myéline permet alors à un PA de se régénérer successivement à chaque nœud de Ranvier par un phénomène de dépolarisation en chaîne. Aux nœuds de Ranvier, un PA est régénéré par la forte densité en canaux sodiques voltage- dépendant et la propagation demeure unidirectionnelle en raison de la période réfractaire post-dépolarisation observée au niveau des nœuds de Ranvier précédemment parcourus.

On parle alors d'éléments (ou neurone) présynaptiques et postsynaptiques pour désigner respectivement les versants émetteurs et récepteurs des synapses.

ii. Transmission de l'influx nerveux

Lorsque le signal de nature électrique ou potentiel d'action (PA) est généré au niveau d'un neurone (**Figure 9**), des mouvements ioniques (sodiques et potassiques) à travers la membrane axonale induisent une dépolarisation (inversion de l'orientation des charges électriques de part et d'autre de la membrane) qui se propage le long de la membrane axonale jusqu'à atteindre le bouton synaptique au niveau de l'extrémité axonale. Au niveau des boutons synaptiques, la dépolarisation provoque l'ouverture de canaux calcium voltage-dépendant et la libération des molécules de neurotransmetteurs contenus dans les VSs (**Figure 10**). Ce mécanisme de libération évoquée de neurotransmetteurs est communément appelé exocytose.

iii. Cycle des vésicules synaptiques

Les VSs sont des vésicules d'environ 40 nm spécialisées dans le stockage, transport et la libération des neurotransmetteurs. Elles sont présentes en très grande quantité dans les boutons synaptiques et effectuent un cycle permanent de libération et chargement en neurotransmetteurs. Ainsi, les vésicules ayant été exocytées sont régénérées par endocytose puis rechargées en neurotransmetteurs afin de pouvoir libérer de nouveau leur contenu (**Figure 11**). Le remplissage des VSs avec de nouveaux neurotransmetteurs cytosoliques, est assuré par l'action conjointe d'une pompe à proton vésiculaire (v-ATPase) et de transporteurs spécifiques présents dans la membrane des VSs. Une fois chargées en neurotransmetteurs, les VSs vont constituer un pool de réserve prêt à être mobilisé pour de nouveaux événements de fusion. L'influx rapide de calcium (Ca^{2+}) provoqué par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant à la suite de l'arrivée d'un potentiel d'action, est capable de déclencher l'exocytose dans une fenêtre temporelle de seulement quelques centaines de microsecondes (Katz and Miledi, 1967). Pour assurer cette rapidité de réponse, les modèles actuels du processus de fusion assument que celui-ci est préparé dans le neurone par des étapes successives d'amarrage (docking) et d'amorçage (priming) des VSs (**Figure 11**).

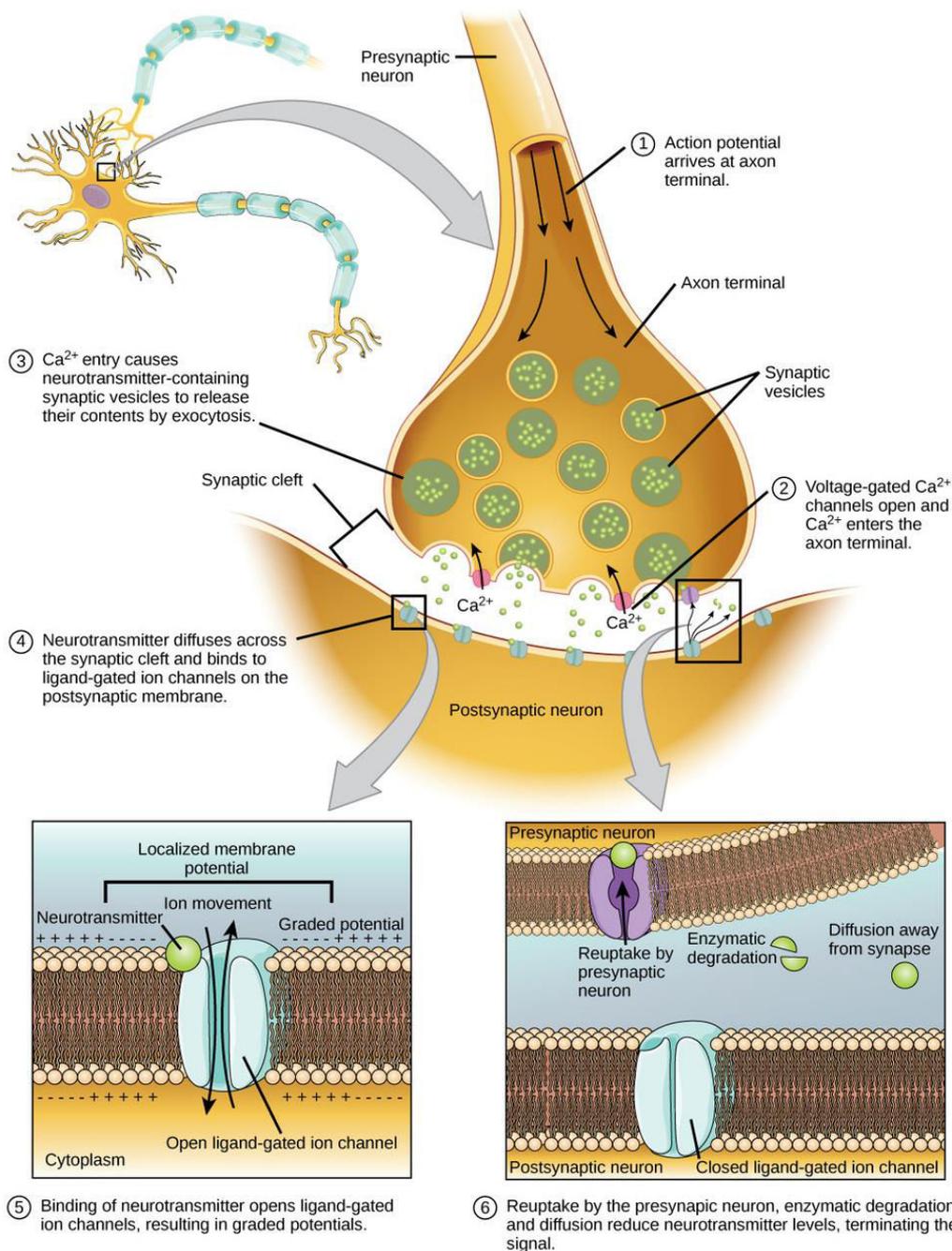


Figure 10 : Les principales étapes de la transmission synaptique. Dans un premier temps, l'arrivée d'un signal électrique nommé potentiel d'action à la terminaison axonale (1) induit l'ouverture de canaux calcium voltage-dépendant (2). L'influx calcique déclenche alors la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique par un processus d'exocytose (3). Les vésicules synaptiques libèrent alors les neurotransmetteurs qui diffusent dans la fente synaptique jusqu'à atteindre des récepteurs spécifiques de la membrane postsynaptique (4). Ces récepteurs postsynaptiques comprennent des canaux ioniques ligand-dépendant dont l'ouverture est induite par la liaison de neurotransmetteurs. L'ouverture conditionnée de ces canaux ionique génère une modification locale du potentiel de membrane (5) qui constitue un nouveau message électrique dans le neurone postsynaptique. Enfin, les neurotransmetteurs sont éliminés de la fente synaptique soit par récupération et recyclage dans le neurone présynaptique, soit par dégradation enzymatique ou soit par diffusion hors de la synapse (6). (source : OpenStax College, How Neurons Communicate. October 17, 2013).

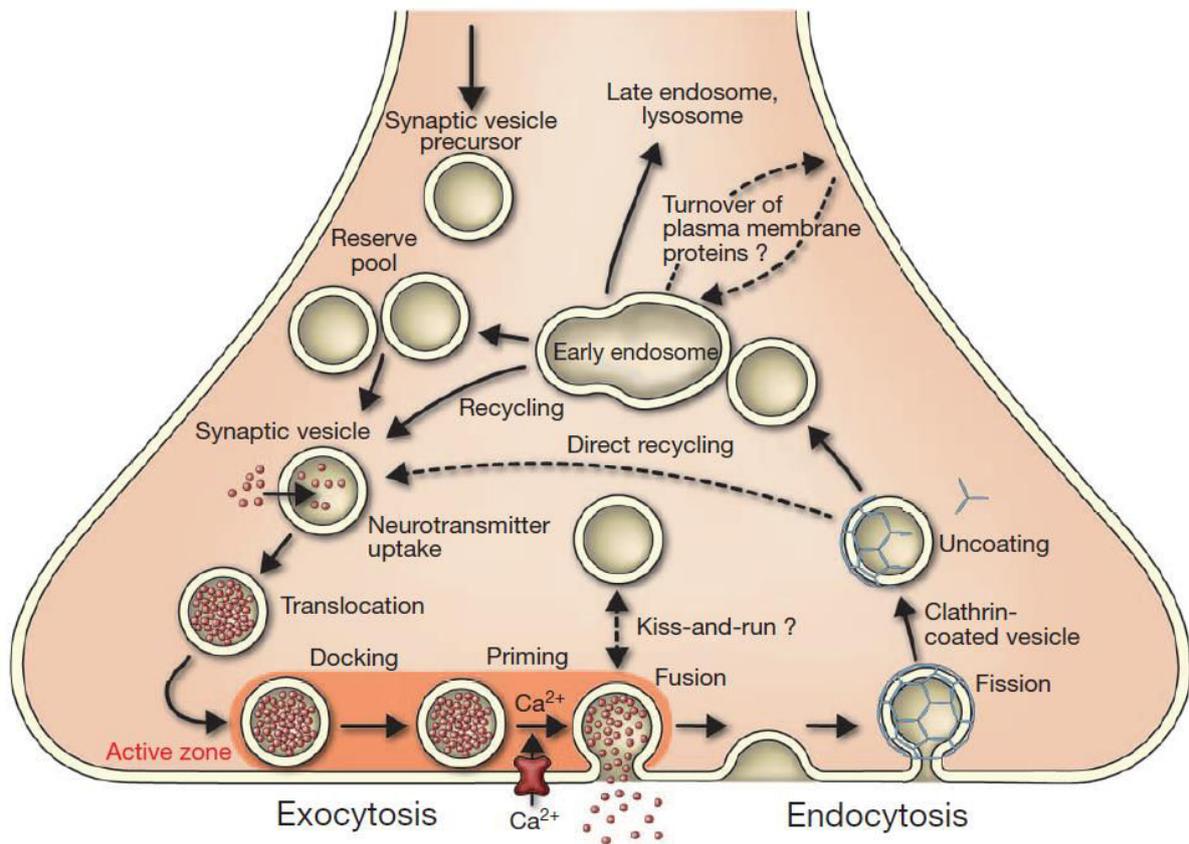


Figure 11 : Le cycle des vésicules synaptiques impliqué dans la neurotransmission. Des vésicules provenant des endosomes précoces (Early endosome) accumulent des molécules de neurotransmetteurs via des transporteurs spécifiques. Les vésicules chargées en neurotransmetteurs s'amarrent au niveau des zones actives (Docking). Après une étape de maturation (priming) les VSs fusionnent et libèrent leur contenu vésiculaire. Les VSs sont endocytées par un processus d'endocytose dépendant de la clathrine et recyclées dans les endosomes précoces ou bien rechargées en neurotransmetteurs pour participer à un nouveau cycle d'exocytose. Une alternative à l'endocytose classique, le mécanisme de kiss-and-run propose la formation d'un pore transitoire et un retrait rapide de la vésicule indépendamment de l'endocytose clathrine dépendante (d'après Jahn & Fasshauer 2012).

iv. Libération des neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs étant stockés dans les VSs, leur libération dans la fente synaptique requiert la fusion des VSs avec la membrane plasmique, laquelle est engagée suite à l'augmentation de la concentration locale de Ca^{2+} au niveau de domaines spécialisés de la membrane présynaptique ou zones actives. Des canaux calciques sensibles au potentiel de membrane servent alors d'intermédiaire entre le PA et la libération de neurotransmetteurs en permettant un influx de Ca^{2+} extracellulaire lorsque la membrane est suffisamment dépolarisée (**Figure 11**). Une fois libérés dans la fente synaptique, les neurotransmetteurs diffusent jusqu'à la membrane postsynaptique sur laquelle sont exprimés des récepteurs de type ionotropiques ou métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques correspondent à des canaux ioniques ligand-dépendant, dont l'ouverture est conditionnée par la liaison des neurotransmetteurs. Cette liaison entraîne des flux ioniques modifiant le potentiel membranaire postsynaptique pour reconstituer un signal électrique, soit un éventuel potentiel d'action qui pourra se transmettre en aval. Dans le cas des récepteurs métabotropiques, une cascade transductionnelle impliquant des récepteurs couplés aux protéines G est mise en jeu.

Il existe plusieurs types de neurotransmetteurs libérés par les neurones présynaptiques. Dans le système nerveux central, on recense principalement le glutamate, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et l'acétylcholine libérés par les VSs. D'autres neurotransmetteurs tels que la dopamine, l'adrénaline, la noradrénaline et de nombreux peptides sont aussi sécrétés par certains neurones à partir de vésicules de plus gros diamètre atteignant 100 nm et appelés vésicules larges à cœur dense (VLCD). Plusieurs types de récepteurs spécifiques aux différents neurotransmetteurs sont exposés par les membranes postsynaptiques. Les différentes combinaisons de neurotransmetteurs avec leurs récepteurs associés permettent alors de multiples modulations de la neurotransmission. Les neurones libérant du glutamate sont dits « excitateurs » car ils induisent une dépolarisation des membranes postsynaptiques en faveur de la transmission du signal à la prochaine synapse neuronale. A l'inverse, les neurones libérant du GABA sont dits « inhibiteurs » car l'interaction de ces neurotransmetteurs avec leurs récepteurs postsynaptiques produit une hyperpolarisation membranaire qui s'oppose à la génération du

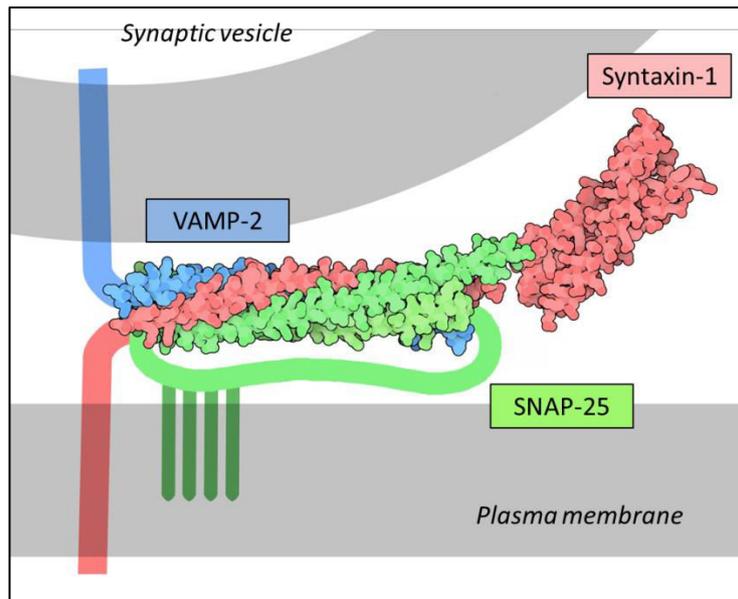


Figure 12 : Le complexe SNARE impliqué dans la fusion des vésicules synaptiques. Les hélices- α appartenant à la VAMP2 (bleue), à la SNAP25 (vert) et à la syntaxine-1 (rouge) s'organisent en faisceau torsadé pour relier la membrane vésiculaire à la membrane plasmique.

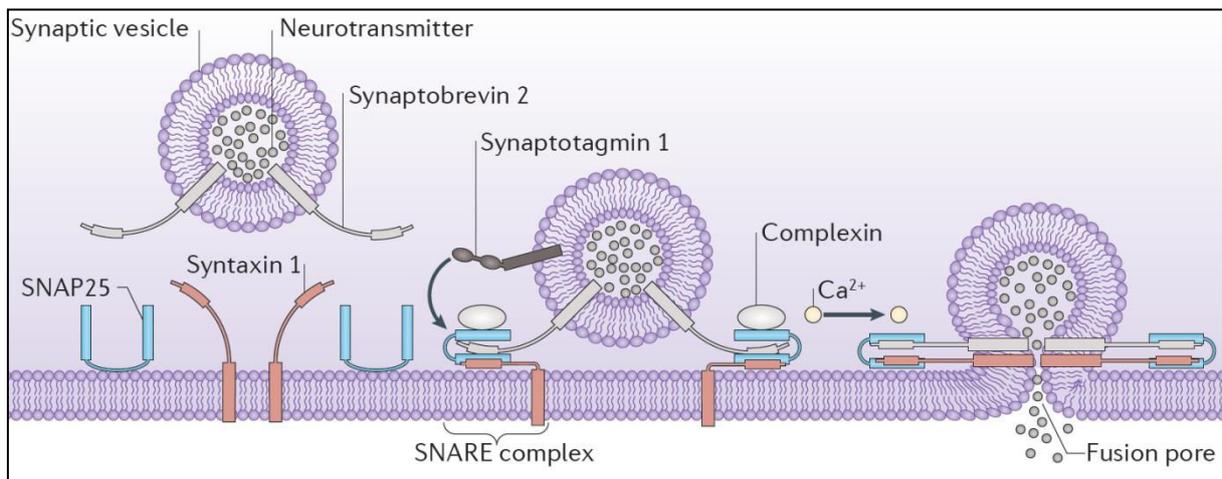


Figure 13 : L'assemblage du complexe SNARE responsable de la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique. Dans un premier temps, la syntaxine 1, la SNAP25 et la VAMP2 (synaptobrevin 2) s'assemblent en faisceau pour entamer la formation du complexe SNARE, lequel relie la vésicule synaptique à la membrane plasmique. L'assemblage du complexe SNARE peut être comparé à une fermeture éclair. Avant que l'assemblage n'aboutisse au rapprochement maximal de la vésicule, la complexine puis la synaptotagmine interagissent avec le complexe SNARE en maintenant cet état d'assemblage partiel. Dans un second temps, l'arrivée locale de calcium provoque la levée des « cales protéiques » pour permettre la finalisation de l'assemblage du complexe SNARE se traduisant par la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique (d'après Kavalali et al. 2015).

PA. L'intervention des autres neurotransmetteurs est notamment responsable de modulations plus fines qui ajoutent davantage de complexité à la transmission synaptique. Dans le cas des JNMs, les neurones commandant la contraction musculaire ou motoneurones sont de type excitateurs et sécrètent de l'acétylcholine. Les synapses neuromusculaires présentent certaines spécificités structurales et fonctionnelles liées à la nature de la cellule réceptrice qui correspond à une cellule musculaire ou myocyte. Par exemple, la quantité significative de neurotransmetteurs libérée suite à un unique PA permet d'induire une réponse contractile immédiate et robuste contrastant avec le phénomène de sommation de potentiels post-synaptiques, rencontré dans d'autres synapses excitatrices (Slater, 2015). Néanmoins, le mode de fonctionnement du motoneurone ne se différencie pas vraiment de la majorité des neurones excitateurs. En effet, on y retrouve un couplage classique de la libération des neurotransmetteurs avec l'activité des canaux calciques voltage-dépendant.

v. Machinerie moléculaire de la libération des neurotransmetteurs

La machinerie moléculaire au cœur de la fusion des VSs se compose de protéines de la famille SNARE (pour Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) ainsi que d'autres protéines associées (Söllner et al., 1993). Parmi les protéines SNARE engagées dans l'exocytose, certaines sont localisées dans la membrane plasmique (t-SNAREs) alors que d'autres sont insérées dans la membrane vésiculaire (v-SNAREs). Dans le cas classique de la libération évoquée, trois protéines interagissent en formant un complexe ternaire: la syntaxine 1 (STX1) et la SNAP25 (protéine de 25kDa associée aux synaptosomes) pour les t-SNAREs, et la synaptobrevine 2 (VAMP2) en tant que v-SNARE (Jahn and Fasshauer, 2012). La VAMP2 et la STX1 sont insérées dans les membranes via leur domaine transmembranaire alors que la SNAP25 est rattachée à la membrane plasmique par des résidus cystéines palmitylés.

Le complexe SNARE s'apparente à une torsade formée à partir de quatre α -hélices enroulées ensemble : deux hélices engagées pour la SNAP25, une pour la syntaxine 1 et une pour la VAMP2 (Sutton et al., 1998) (**Figure 12**). L'assemblage progressif de cette structure, qui évoque la fermeture d'un zip, permet un rapprochement en plusieurs phases de la VS vers la membrane plasmique aboutissant à la fusion des deux membranes

Serotype	Protein Receptor
BoNT/A	<i>N</i> -glycosylated SV2A, B, C
BoNT/B	Synaptotagmin I and II
BoNT/C	— *
BoNT/D	<i>N</i> -glycosylated SV2A, B, C
BoNT/DC	Synaptotagmin I and II
BoNT/E	<i>N</i> -glycosylated SV2A, B
BoNT/F	<i>N</i> -glycosylated SV2A, B, C
BoNT/G	Synaptotagmin I and II

* BoNT/C interacts with ganglioside only; there is no protein receptor identified so far.

Tableau 2 : Les récepteurs protéiques des différents sérotypes de BoNTs (d'après Peck et al. 2017).

(Weber et al., 1998). Après l'initiation de leur assemblage, l'état d'association des hélices du complexe SNARE est régulé par l'intervention de protéines partenaires (**Figure 13**) comme la complexine (Jorquera et al., 2012), la calmoduline (Di Giovanni et al., 2010) et la synaptotagmine 1 (SYT1). Cette dernière possède deux domaines C2 pouvant lier le calcium et les phospholipides et est considérée comme le senseur calcique de l'exocytose régulée (Südhof, 2013). Schématiquement, ces protéines régulatrices stabilisent le complexe SNARE dans un état d'assemblage intermédiaire où les α -hélices ne sont pas complètement enroulées les unes autour des autres. L'assemblage complet de la torsade du complexe SNARE aboutissant à la fusion, n'intervient alors qu'à la suite de l'entrée calcique (Südhof and Rothman, 2009) qui va permettre au complexe SNARE d'achever son assemblage, tel une fermeture éclair finissant de se refermer (**Figure 13**).

b. Les étapes du blocage de la neurotransmission par les toxines botuliques

i. *Ciblage spécifique des neurones périphériques*

Après avoir franchi la barrière intestinale, les BoNTs diffusent dans le système lymphatique et accèdent à la circulation sanguine, milieu dans lequel elles sont très stables (Simpson, 2013). En quelques minutes, elles atteignent les terminaisons nerveuses cholinergiques du système nerveux périphérique et notamment les zones non-myélinisées des motoneurones.

La liaison sur les neurones des BoNT/A, B, E, F et G fait intervenir deux types de récepteurs : un récepteur de type lipidique en coopération avec un récepteur protéique (**Tableau 2**). Dans le cas de la BoNT/C les récepteurs actuellement identifiés sont exclusivement lipidiques (Peck et al., 2017). Les deux principaux récepteurs lipidiques des BoNTs le GT1b et le GD1a appartiennent à la famille des gangliosides poly-sialylés. Outre ces lipides complexes, deux protéines ont été identifiées en tant que récepteurs des BoNTs : la SYT, et la protéine SV2 (pour Synaptic Vésicle glycoprotein 2), deux protéines membranaires qui partagent la particularité d'être exprimées dans les VSs neuronales (Takamori et al., 2006) (voir deuxième partie de l'introduction).

La SYT est le récepteur protéique de la BoNT/B de la BoNT/G et de la BoNT/DC (Nishiki et al., 1996a; Rummel et al., 2004; Dong et al., 2007; Peng et al., 2012). La protéine SV2 a été successivement identifiée comme étant impliquée dans la liaison de la BoNT/A, de la BoNT/E

de la BoNT/F et enfin celle de la BoNT/D (Dong, 2006; Dong et al., 2008; Fu et al., 2009; Peng et al., 2011). Cependant la reconnaissance de SV2 par BoNT/D est controversée. Par ailleurs, cette toxine, contrairement aux autres sérotypes, possède comme la BoNT/C et la BoNT/DC plusieurs sites de liaison aux glycolipides (Kroken et al., 2011). Pour la SYT comme pour SV2, le site impliqué dans la liaison aux BoNTs se localise dans un domaine orienté dans la lumière des VSs. Par conséquent, c'est seulement lors de l'exocytose neuronale que les récepteurs protéiques des BoNTs se retrouvent dans la membrane plasmique pour exposer des sites de liaison orientés vers le milieu extracellulaire (**Figure 14**). Ce tropisme pour les terminaisons nerveuses périphériques cholinergiques est remarquable compte tenu du fait qu'il n'y a pas de distribution sélective des BoNTs dans les micro-compartiments péri-neuronaux de la périphérie et que les surfaces exposées de ces neurones ne représentent qu'une partie très minime des surfaces cellulaires en contact avec les BoNTs (Simpson, 2013). Par conséquent, en assumant que la concentration de toxine au voisinage des neurones périphériques n'est pas différente de celle de l'environnement des autres cellules, la principale particularité de ces neurones demeure, en dehors de leur accessibilité, leur capacité à extraire les toxines du milieu extracellulaire.

ii. Internalisation neuronale

Les molécules de toxine liées entrent dans le neurone en empruntant principalement une voie dépendante de la clathrine utilisée pour le recyclage des VSs (**Figures 11, 14**). Des expériences d'immunofluorescence sur des neurones en culture ont montré que les BoNTs étaient internalisées avec leurs récepteurs protéiques (Dong et al., 2003, 2008). Récemment le groupe de Montecucco a démontré par des techniques de microscopie électronique qu'une ou deux molécules de BoNT/A étaient localisée dans des VSs (Colasante et al., 2013), ce qui concorde bien avec le nombre de récepteur SV2 estimé dans les membranes des VSs (Takamori et al., 2006). Ainsi, le récepteur protéique de la BoNT/A apparaît comme le facteur limitant pour l'internalisation et non pas les gangliosides (Colasante et al., 2013).

Des résultats obtenus avec la HC/A1 montrent que la neurotoxine est rapidement internalisée *in vivo* ou sur des cultures de neurones (Harper et al., 2011; Colasante et al., 2013). La vitesse d'entrée rapide de la BoNT/A1 correspond à celle de l'endocytose des VSs (Saheki and De Camilli, 2012), ce qui est d'ailleurs cohérent avec la vitesse de paralysie des

nerfs phréniques observée sur des préparations d'hémi-diaphragme de souris (Rossetto et al., 2014). Par conséquent, même si les voies d'endocytose empruntées par les BoNTs ne sont pas complètement identifiées, la capacité que possèdent toutes les BoNTs à paralyser rapidement les nerfs phréniques du diaphragme de souris suggère fortement qu'elles utilisent toutes une même stratégie du « cheval de Troie vésiculaire » pour rentrer dans le neurone *in vivo*.

L'activité neuronale est un facteur déterminant pour l'internalisation des BoNTs. Par exemple, la dépolarisation neuronale induite expérimentalement par l'application d'un tampon enrichi en chlorure de potassium, augmente la proportion de BoNT/B internalisée dans les neurones de diaphragme de souris (Dong et al., 2003). Ainsi, lorsque le neurone est dépolarisé, l'augmentation de cadence du cycle des VSs est responsable de deux phénomènes susceptibles de potentialiser l'internalisation des BoNTs. Premièrement, l'augmentation de l'exocytose vésiculaire se traduit par une exposition plus importante des récepteurs protéiques (SYT et SV2) à la surface neuronale (Dong et al., 2003), ce qui offre aux BoNTs autant de sites potentiels de forte affinité. Deuxièmement, l'augmentation en miroir de l'internalisation des VSs, par endocytose compensatrice, accélère directement l'entrée des molécules de toxines tout juste liées.

iii. Translocation cytoplasmique

Afin de pouvoir atteindre leurs protéines cibles, les molécules de BoNTs qui ont été internalisées doivent préalablement gagner le compartiment cytosolique. Pour cela, les BoNTs réalisent la translocation cytoplasmique de leur domaine LC. Le déclenchement de cette étape de translocation repose sur la baisse de pH dans l'environnement de la BoNT. Cette acidification de la lumière vésiculaire qui est indispensable au rechargement des VSs en neurotransmetteurs intervient via la pompe à proton vésiculaire (v-ATPase), qui génère un gradient de pH en faisant rentrer des protons (**Figure 14**). D'ailleurs, le blocage de la v-ATPase par des inhibiteurs spécifiques tels que la bafilomycine A1 entrave la translocation des BoNTs (Keller et al., 2004; Colasante et al., 2013). Les BoNTs ont ainsi évolué pour tirer avantage de deux mécanismes physiologiques caractéristiques des terminaisons nerveuses.

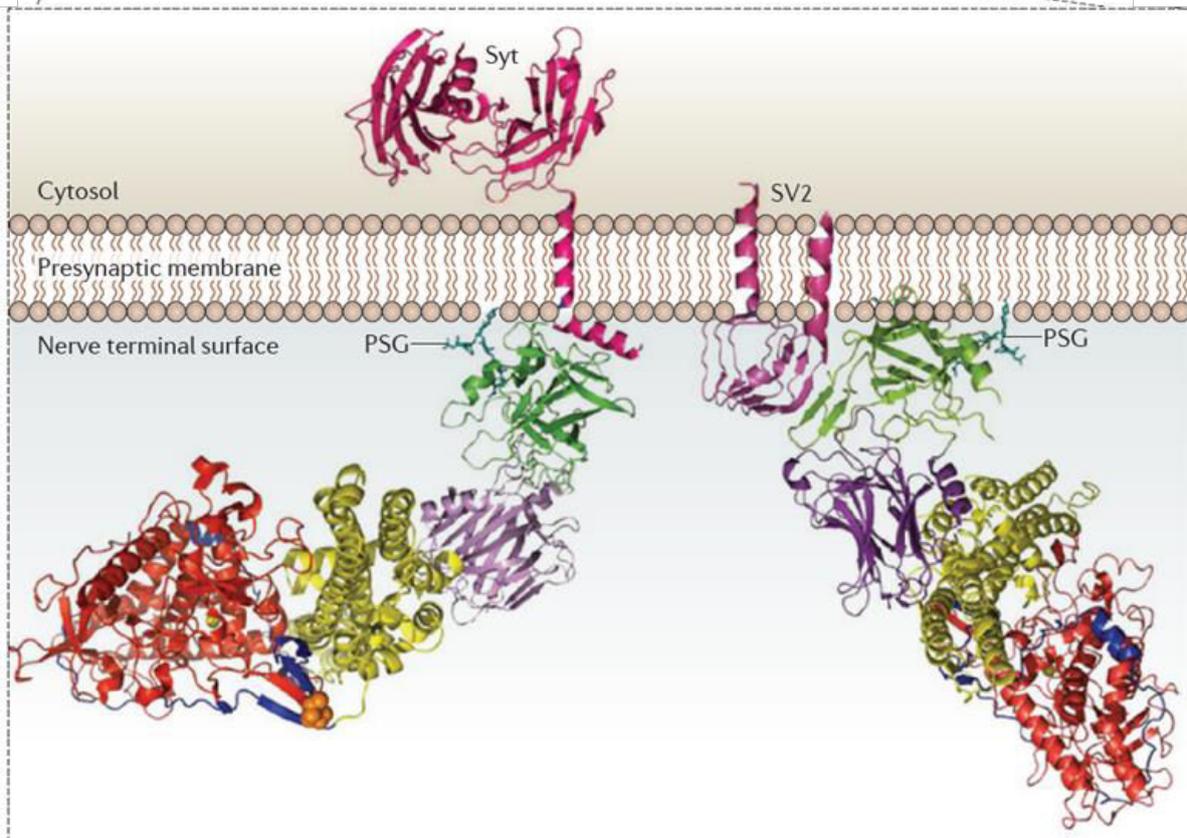
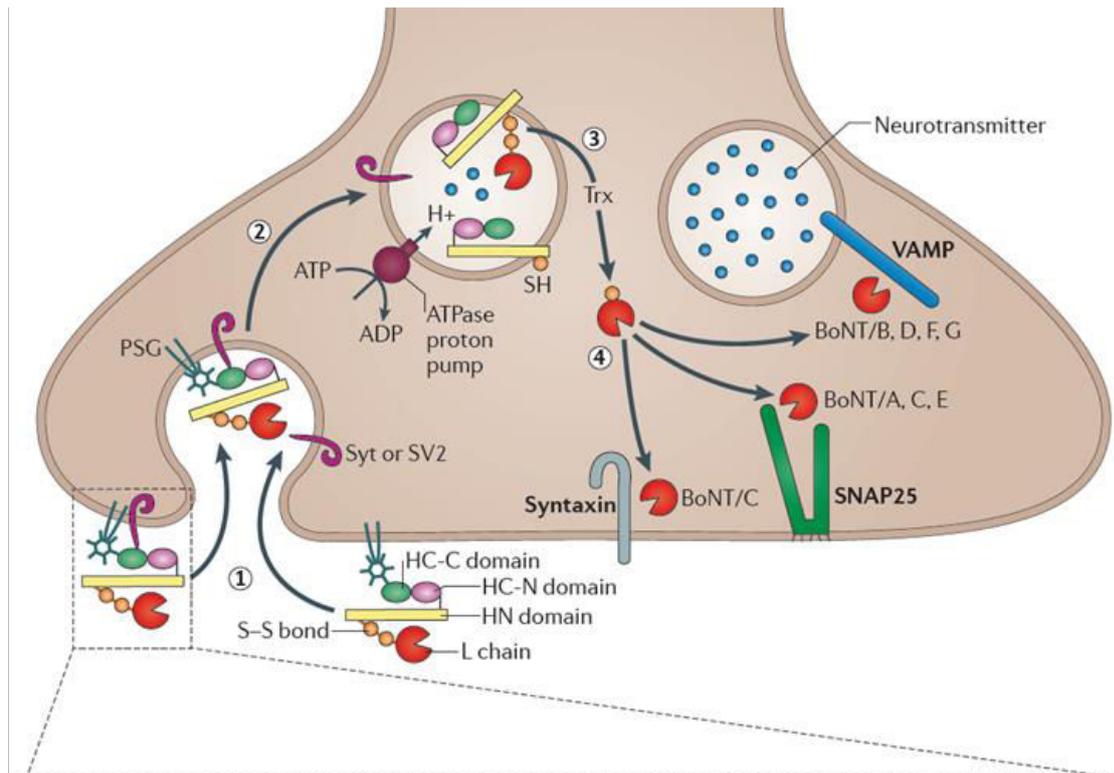


Fig.14 : Liaison, internalisation et clivage protéolytique des cibles des toxines botuliques dans les terminaisons axonales. La première étape (1) de l'intoxication du neurone implique la liaison du domaine H_C de la toxine sur le double récepteur constitué par un ganglioside polysialylé (PSG) et un récepteur protéique (Syt or SV2). Les structures obtenues en cristallographie pour la liaison de la BoNT/B sur la SYT et le ganglioside (gauche) ainsi que celle de la BoNT/A sur le ganglioside et la boucle L4 de SV2 (droite) sont montrées en bas dans l'encadré pointillé. Après sa liaison sur la membrane présynaptique, la toxine est ensuite endocytée à l'intérieur de vésicules synaptiques nouvellement formées par endocytose depuis la membrane plasmique (2). Pour entrer dans la cellule, les toxines empruntent ainsi la voie de recyclage des vésicules synaptiques dont les compartiments luminaux s'acidifient sous l'action de la pompe à proton. Cette acidification a pour conséquence un changement de conformation de la toxine qui permet la translocation cytoplasmique de sa chaîne légère (3). La chaîne légère est libérée du domaine HN via un système thioredoxine reductase – thioredoxine (Trx) qui clive le pont disulfure reliant les deux chaînes de la toxine (S-S bond). Une fois libre dans le cytosol, la chaîne légère clive une cible SNARE spécifique ce qui se traduit par une inhibition de la libération des neurotransmetteurs responsable d'un blocage de la neurotransmission (d'après Rossetto et al. 2014).

D'une part l'endocytose des VSs afin de rentrer dans la cellule cible et d'autre part, le rechargement en neurotransmetteurs des VSs pour délivrer le domaine LC dans le cytosol.

Initialement, il avait été montré qu'à pH acide la BoNT/B comme la HCB possèdent la capacité de s'insérer dans des bicouches membranaires planes pour former des canaux de basse conductance (Hoch et al., 1985). Plus tard, cela a été montré avec les BoNT/A et E dans des cellules de la lignée PC12 (cellules dérivées de phéochromocytome de rat) (Sheridan, 1998). Ainsi, un lien entre cette formation de canal et l'étape de translocation a logiquement émergé dans la littérature avec des auteurs proposant une traversée membranaire de la partie LC via le canal formé par la partie HC (Koriazova and Montal, 2003; Fisher and Montal, 2006).

Dès lors, une avancée considérable dans la compréhension du mécanisme de translocation des BoNTs a été apportée par la technique de patch clamp, notamment employée sur les cellules PC12 ou Neuro2A (dérivées de neuroblastome de souris). Cette approche expérimentale permet d'examiner les événements se produisant au niveau d'un canal unique tout en mimant les conditions *in vivo* (Fischer and Montal, 2007a; Rossetto et al., 2014). Des études réalisées majoritairement sur les sérotypes A, B et E ont alors mis en lumière plusieurs point-clé de la séquence d'évènements moléculaires associés au processus de translocation. Ainsi, bien que le mécanisme de translocation n'ait été étudié que pour certains sérotypes, la somme d'éléments accumulée par les observations de différents groupes permet d'établir un modèle (**Figure 15**).

La capacité de la partie HC à former des canaux membranaires repose sur un domaine de la partie H_N, aussi appelée domaine de translocation. Les caractéristiques des canaux formés par la BoNT, comme les profils de conductance unitaire ou la dépendance au voltage de leur ouverture, sont similaires pour la BoNT/A entière, le domaine H_N ou le domaine H_N dépourvu de la région ceinture qui protège la région catalytique de la LC (Fischer and Montal, 2013). Ainsi, alors que la H_N seule peut induire la formation d'un canal à pH neutre, la partie C-terminale de H_C impliquée dans la double reconnaissance des récepteurs neuronaux serait indispensable pour coordonner la formation d'un canal avec une diminution de pH afin d'assurer la translocation (Fischer and Montal, 2013). De plus, des résultats obtenus avec la BoNT/B indiquent que le changement de conformation nécessaire à la formation du canal ne se produit que lorsque la toxine est liée au GT1b par le domaine H_{CC} (Sun et al., 2011). Dans ce sens, le domaine H_{CC} aurait un rôle déterminant dans la

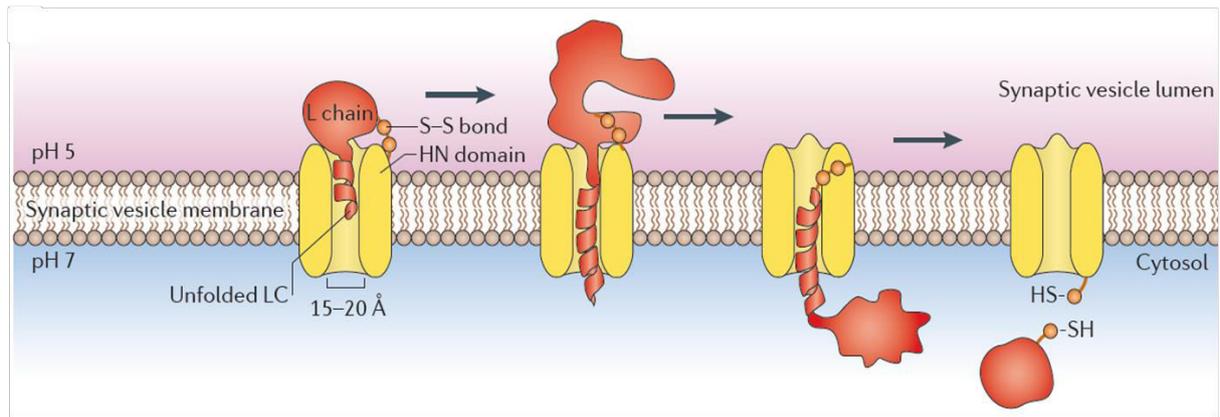


Figure 15 : Modèle pour la translocation cytoplasmique de la LC des BoNTs. Lorsque la lumière de la vésicule synaptique s'acidifie (pH=5 ; violet) la molécule de BoNT engage dans un premier temps un changement de conformation important qui provoque l'insertion du domaine H_N dans la membrane vésiculaire. Ce domaine H_N forme alors un canal (jaune) dont le diamètre est compris entre 15 et 20 Å tout en conservant son lien avec la partie LC (rouge) par le biais d'un pont disulfure (S-S bond ; paire de ronds en orange). La partie LC, dont le repliement initial n'est pas compatible avec la traversée du canal formé par H_N déplie sa structure tertiaire pour pouvoir pénétrer le pore du canal sous forme d'hélice- α . Lorsque la LC gagne le versant cytosolique, lequel représente un environnement reducteur avec un pH neutre, celle-ci se replie dans une conformation fonctionnelle et sa libération est achevée par la réduction du pont disulfure. Les LCs ainsi libérées dans le cytosol peuvent alors atteindre et cliver des protéines SNAREs spécifiques (d'après Rossetto et al. 2014).

régulation et la cohérence spatio-temporelle de la translocation, en ne permettant son déclenchement que lorsque la lumière de la VS s'acidifie. D'autre part, il a été proposé que le domaine H_N, en position N-terminale de HC, participerait au positionnement et à la pré-insertion de la BoNT, et ce, via une interaction avec la membrane passant par des molécules de phosphatidyl-Inositol Phosphates (Muraro et al., 2009).

Au-delà de la simple formation d'un canal, l'attribution d'une activité de type translocase à la partie HC exige aussi que la partie LC soit capable de traverser le canal identifié. Or, la structure tertiaire de la partie LC n'est à priori pas compatible avec le diamètre du canal, estimé entre 15 et 20 Å (Rossetto et al., 2014). Par conséquent, le modèle généralement décrit assume que la LC change de conformation, adoptant alors une structure secondaire en hélice- α afin de traverser le canal formé par la partie HC (**Figure 15**). Cette hypothèse est notamment appuyée par le blocage de la translocation de la LC/A par la présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre la LC (Fischer et al., 2008). Ainsi il apparaît que la stabilisation de la LC dans sa conformation native entrave son passage au travers du canal HC (Rossetto et al., 2014). Enfin, une fois que la partie LC dépliée s'est insérée dans le canal HC, l'ultime étape de la translocation requiert sa dissociation de la partie H_N avec laquelle elle est reliée par un pont disulfure intercaténaire. Dans le neurone, cette dissociation intervient par une réduction du pont disulfure lorsque la LC gagne le versant cytosolique à la fin du processus de translocation (Fischer and Montal, 2013). Cette réaction est notamment catalysée par le système thioredoxine/thioredoxine reductase (Pirazzini et al., 2013). L'environnement réducteur du cytosol est indispensable pour assurer la libération de la partie LC. Dans le cas contraire la LC n'est pas libérée et le canal HC reste partiellement obstrué par la partie LC toujours associée (Fischer and Montal, 2007a, 2007b). A l'opposée, la pré-réduction de la BoNT/A avant la translocation induit la formation de canaux HC incapables de transloquer la partie LC (Fischer and Montal, 2013).

L'étude de cette étape de translocation a révélé que les différents domaines de la BoNT endossent mutuellement des fonctions de protéines chaperonnes pour assurer la translocation (Fischer and Montal, 2013) : Pour la BoNT/A comme pour la BoNT/B, la présence de la partie HC assure que le dépliement structurel de la partie LC soit synchrone avec la formation du canal membranaire (Fischer et al., 2008; Sun et al., 2011). Pour sa part, la partie LC maintient la H_N en conformation soluble jusqu'à ce que la diminution de pH ne provoque son insertion membranaire (Fischer and Montal, 2007a).

iv. Activité enzymatique

Les LCs des BoNTs sont des métalloprotéases à zinc possédant une remarquable spécificité de reconnaissance envers leurs cibles (Pantano and Montecucco, 2014; Rossetto et al., 2014). Une fois libérées dans le cytosol neuronal, elles reconnaissent et clivent les protéines SNAREs impliquées dans la fusion des VSs. Chaque neurotoxine à l'intérieur d'un même sous-type clive la même cible au même pont peptidique excepté pour la BoNT/F5 (Kalb et al., 2012).

Les BoNTs A, C et E clivent la SNAP25, tandis que les BoNTs B, D, F et G clivent la VAMP1 et la VAMP2. De plus, la BoNT/C est responsable d'un second type de clivage sur la syntaxine 1, ce qui en fait le seul sérotype capable de cliver deux cibles neuronales distinctes (**Figure 16**). Pour autant, le clivage d'une seule protéine SNARE suffit à entraver la fonction du complexe entier. Par ailleurs, un blocage total de la libération de transmetteurs peut être produit alors que seule une faible proportion des SNARE est clivée (Raciborska et al., 1998), bloquant ainsi les VSs qui s'accumulent aux sites de fusion (Poulain et al., 2008).

Dans les cellules non neuronales, de nombreuses isoformes de SNAREs sont exprimées, dont certaines sont potentiellement clivables par les BoNTs. Néanmoins, faute de récepteurs spécifiques exprimés à leur surface, ces cellules ne sont pas affectées par les BoNTs. Les BoNTs clivent les protéines SNARE sous forme monomérique. Leur association en complexe peut néanmoins leur offrir une protection totale ou partielle, selon que le complexe est lâche ou serré (Humeau et al., 2000; Pantano and Montecucco, 2014).

En observant la localisation des sites de clivage identifiés, on remarque que la majorité des BoNTs scindent les SNAREs en emputant une partie conséquente de la protéine, ce qui entrave logiquement l'assemblage du complexe SNARE (Hayashi et al., 1994) (**Figure 16**). Par contre, dans le cas du clivage de la SNAP25 par la BoNT/A ou la BoNT/C, moins d'une dizaine d'acides aminés de l'extrémité C-terminale sont seulement retirés (**Figure 16**), ce qui permet toujours la formation d'un complexe SNARE (Hayashi et al., 1994). Toutefois, la délétion cette partie C-terminale de la SNAP25 pourrait conduire au blocage de la libération de neurotransmetteurs, soit en empêchant l'association des complexes SNAREs entre eux (Pantano and Montecucco, 2014), soit en perturbant la liaison de la SNAP25 à la SYT senseur principal de calcium lié à la fusion des VSs (Kedar et al., 2015). La récupération fonctionnelle induite par l'ajout extracellulaire de calcium à forte concentration après une intoxication

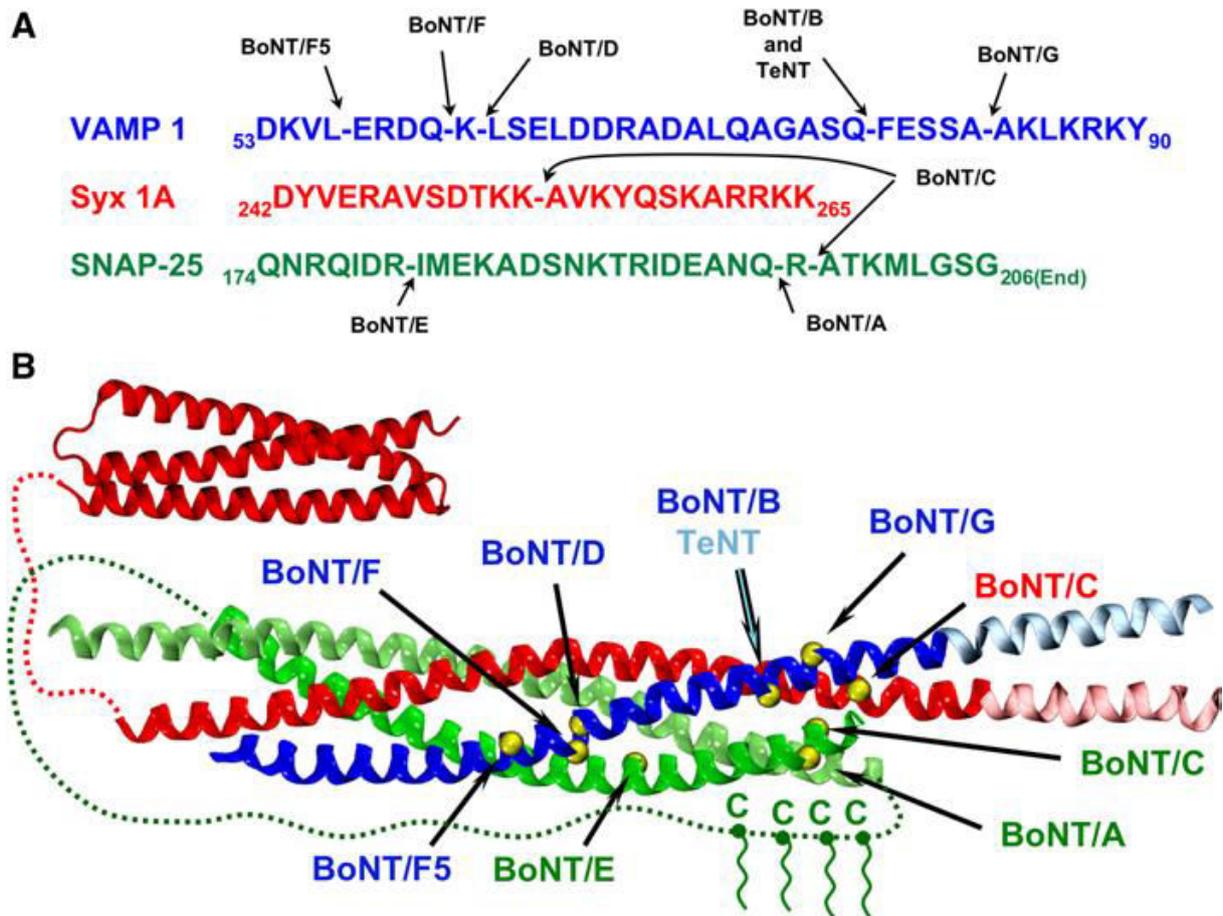


Figure 16 : Les sites de clivage identifiés sur les protéines SNAREs pour les différentes BoNTs. A) Les portions de séquences primaires correspondant aux zones de clivage sont affichées pour la synaptobrevine 1 (VAMP1, bleu), la syntaxine 1A (Syx 1A, rouge) et la SNAP25 (vert) de souris (*Mus musculus*). Les tirets séparant certains symboles d'acides aminés représentent les ponts clivés par les différents sérotype. Ainsi, les BoNT/B, D, F, G ainsi que la toxine tétanique (TeNT) clivent la protéine VAMP1 alors que les BoNT/A, C et E clivent la SNAP25. On peut remarquer que la BoNT/C clive également la Syx 1A et que la BoNT/F5 utilise un site de clivage distinct de celui des autres sous-types de BoNT/F. B) Représentation du complexe SNARE avec les différents sites de clivage : la VAMP, la syntaxine et la SNAP25 sont respectivement représentées en bleu, rouge et vert. Les couleurs plus claires sur la VAMP et la SNAP25 figurent les domaines transmembranaires qui s'étendent au-delà du nœud à 4 hélices (structure PDB 3IPD). La ligne de pointillées rouges représente le segment non structuré, reliant le nœud à trois hélices de la syntaxine au complexe SNARE (structure PDB 1EZ3). La ligne de pointillées vertes représente la région liant les deux hélices de la SNAP25, laquelle 4 résidus cystéines palmitoylés rattachant la protéine à la membrane plasmique (« C » en vert). Les ronds jaunes quant à eux figurent les derniers acides aminés localisés juste en amont des différents sites de clivage. Cette représentation n'a pour seul but que d'offrir une vision plus compréhensive des sites de clivages, puisque les BoNTs ne clivent pas les SNAREs déjà engagées dans le complexe à 4 hélices (d'après Pantano & Montecucco 2014).

par la BoNT/A conforte cette dernière hypothèse (Gerona et al., 2000).

Le site de liaison aux SNAREs décrit une cavité, qui est occupée par le domaine H_N. La libération de la LC dans le cytosol, laisse cette gorge hydrophobe vacante pour qu'elle puisse reconnaître les SNAREs (Rossetto et al., 2014). L'interaction entre la LC et la protéine SNARE ne se limite pas au site de clivage puisqu'il existe d'autres sites d'interaction ou exo-sites qui participent à la reconnaissance spécifique du substrat (Rossetto et al., 1994). L'étude du co-cristal obtenu à partir de la chaîne légère de BoNT/A et d'un fragment de SNAP25 (147-204) a montré qu'un domaine de SNAP25 organisée en hélice- α (147-167) comble la cavité hydrophobe allongée de LC et constitue un élément important pour la reconnaissance du substrat. Dans cette même étude, un autre site de SNAP25, organisé en feuillet β (201-204) et important pour le ciblage spécifique de la LC a également été mis en évidence (Breidenbach and Brunger, 2004). L'implication des exo-sites explique pourquoi les LCs requièrent de longues séquences de SNARE pour un clivage optimal (Foran et al., 1994; Vaidyanathan et al., 1999). Les BoNTs, capables de cliver seulement certaines isoformes de SNARE, possèdent une sélectivité exceptionnelle parmi toutes les protéases connues.

4. Botulisme

a. Symptômes et manifestations cliniques

Le botulisme est associé à un syndrome clinique très caractéristique qui débute invariablement par une paralysie symétrique des nerfs crâniens, suivie par une paralysie flasque descendante symétrique pouvant conduire à l'arrêt respiratoire du sujet (Sobel, 2005). Les premiers symptômes se déclarent après une période d'incubation variable, généralement comprise entre 12 et 36 heures post-ingestion pour le botulisme alimentaire (Zhang et al., 2010), mais pouvant aussi bien s'étaler sur plusieurs jours (Rusnak and Smith, 2009).

Au stade précoce de la maladie l'atteinte des nerfs crâniens III, IV et VI provoque une paralysie des muscles extra oculaires se traduisant par des symptômes allant de la vision troublée à la diplopie, et s'accompagnant d'une incapacité d'accommodation pour la vision de près. En parallèle, la paralysie des nerfs VII est à l'origine d'une perte d'expressivité du visage, alors que la paralysie des nerfs IX est directement liée à une dysphagie. La perte de

fonction globale au niveau des nerfs crâniens entraîne également une dysarthrie importante chez le sujet. Par ailleurs, des atteintes au système autonome peuvent provoquer des symptômes comme l'anhydrose ou l'hypotension orthostatique. Dans certains cas de botulisme alimentaire, et particulièrement pour ceux impliquant la BoNT/B ou la BoNT/E, des symptômes gastro-intestinaux de nausées et vomissements peuvent précéder l'apparition des premiers symptômes neurologiques précédemment cités (Sobel, 2005).

Dans une seconde phase de la maladie, la paralysie affectant les nerfs crâniens s'étend progressivement et de façon symétrique aux muscles squelettiques localisés en aval selon l'axe longitudinal du corps. Ainsi cette paralysie descendante affecte dans l'ordre les muscles du cou, ceux des épaules, les muscles proximaux puis distaux des membres supérieurs et enfin les muscles proximaux puis distaux des membres inférieurs. Parmi les nombreux muscles atteints, la paralysie du diaphragme et des muscles respiratoires accessoires est particulièrement grave car elle représente le principal risque de décès, par arrêt respiratoire. Le développement de la maladie amène des symptômes moins critiques comme la constipation qui est fréquemment décrite ou la disparition progressive des réflexes ostéotendineux.

Chez les patients non traités, l'étendue de la paralysie comme sa rapidité de progression restent variables (Sobel, 2005). En effet, les symptômes peuvent se limiter à la perte de fonction de certains nerfs crâniens ou bien se généraliser en une paralysie complète de l'ensemble des muscles volontaires pouvant dans certains cas devenir létale. L'évolution des symptômes peut alors se compter en heures comme en jours avec une vitesse de propagation proportionnelle à la concentration sanguine de BoNTs.

Enfin, de manière remarquable la paralysie décrite pour le botulisme est réversible et permet une récupération fonctionnelle quasi-complète. Outre la dose mise en jeu, la durée d'action des BoNTs varie en fonction du sérotype impliqué. Par exemple, les effets de la BoNT/A peuvent persister plusieurs mois alors que le botulisme induit par la BoNT/E peut se limiter à quelques semaines (Eleopra et al., 1998). Cependant, il existerait une variabilité de sensibilité inter-individus aux BoNTs due par exemple à des profils différents de glycosylation des récepteurs.

Il n'y a pas d'antidote contre le botulisme et le traitement reste symptomatique par assistance respiratoire dans les formes graves de la maladie. Un traitement spécifique repose sur la sérothérapie qui consiste en l'administration d'anticorps produits chez le

cheval contre les BoNTs. Cependant, la sérothérapie opérante sur la toxine circulante, n'est efficace que si l'administration est précoce après l'apparition des premiers symptômes.

b. Différentes formes de botulisme

Depuis les premiers empoisonnements alimentaires recensés chez l'homme, le botulisme a été décrit sous plusieurs autres formes. Le botulisme est associé à un seul syndrome clinique, mais la toxine peut être acquise par des voies différentes. Mais quelle que soit la façon le mode de contamination, l'effet systémique qui en résulte intervient selon le même mécanisme d'action.

i. *Botulisme alimentaire*

L'ingestion d'aliments contaminés (intoxication) par des BoNTs représente la principale cause de botulisme chez l'adulte. La présence de BoNTs dans un aliment s'explique en amont par celle de bactéries clostridiales telles que *C. botulinum*. Le développement optimal de ces organismes est dépendant de certains facteurs comme l'anaérobiose du milieu, un pH relativement neutre, une température comprise entre 35 et 40°C pour la plupart des souches ainsi qu'une faible teneur en sel ou en sucre (**Tableau 3**). Les bactéries clostridiales sont aussi capables de sporuler pour endurer des conditions défavorables (Tsuji and Perkins, 1962). De nos jours, le mode de conditionnement de la majorité des aliments ne rassemble pas les conditions optimales de pousse bactérienne et les techniques industrielles de mise en boîte de conserve a été élaborée afin notamment d'éliminer les spores de *C. botulinum* dans les aliments. Cependant, les spores de *C. botulinum* restent potentiellement dangereuses dans la mesure où la germination peut survenir dans certains types de préparations alimentaires. En particulier, les conserves artisanales ou faites-maison sont davantage susceptibles de favoriser le développement de *C. botulinum* et la libération de BoNTs car la totalité des spores n'est pas toujours éliminée lors de leur confection (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014). Parmi les produits à risque, on retrouve des aliments conservés peu acides: la mortadelle, jambon cru salé et séché, charcuteries (saucisses, pâtés) pour la BoNT/B ; les conserves de végétaux (asperges, haricots verts, carottes, poivrons, potirons, olives à la grecque, etc.) et salaisons à base de viande de bœuf pour la BoNT/A ; le poisson salé et séché, marinades de poissons, poisson ou viande de

	<i>C. botulinum</i> Groupe I Protéolytiques			<i>C. botulinum</i> Groupe II Non protéolytiques			<i>C. botulinum</i> Groupe III Non protéolytiques			<i>C. botulinum</i> Groupe IV Protéolytique		
Toxines	A, B, F			B, E, F			C, D			G		
Sous-types de toxines	A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, bivalent B (Ba, Bf, Ab), proteolytic F			E1, E2, E3, E6, non proteolytic B, F			C, D, C/D, D/C			G		
Bactéries apparentées non toxigènes	<i>C. sporogenes</i>			Pas de nom d'espèces			<i>C. novyi</i>			<i>C. subterminale</i>		
Croissance cellules végétatives	Min .	Opt.	Max.	Min .	Opt.	Max.	Min .	Opt.	Max.	Min .	Opt.	Max.
Température (°C)	10	35-40	48	3	18 - 25	45	15	37 - 40		/	37	/
pH	4,6	/	9,0	5,0	7,0	9,0	5,1	6,1 - 6,3	9,0	4,6	7,0	/
a _w	0,94	/		0,97	/	/	0,97	/		0,94	/	/
% NaCl inhibant la croissance	10			5								
Production toxines												
Température min (°C)	10			3			15			/		
a _w min	0,94			0,97			0,97			0,94		
Stabilité et inactivation des toxines	Les toxines résistent à la congélation (activité de la toxine préformée dans l'aliment non réduite par la congélation). Détruites après 10 min à 100 °C ou 30 min à 80 °C.											

Tableau 3 : Caractéristiques de survie, de croissance et de toxinogénèse de *C. botulinum* (données ANSES : <https://www.anses.fr/fr/search/site/BOTULINUM?iso1=fr&iso2=en>).

phoque fermentée, emballé sous vide, pour la BoNT/E (ANSES, 2011).

Enfin, une faible quantité de toxine suffit à déclencher la maladie puisque la dose létale des BoNTs par voie orale chez l'homme est estimée à seulement 1µg/kg (Sobel, 2005).

ii. Botulisme par blessure

Le botulisme peut se développer suite à la contamination d'une blessure par *C. botulinum*. Dans ce cas, des spores clostridiales provenant de l'environnement se retrouvent au sein d'un abcès où les conditions sont favorables à leur germination. Depuis le début des années 90, cette forme rare de botulisme est particulièrement associée à l'injection de drogues (Werner et al., 2000; Zhang et al., 2010) en particulier aux consommateurs d'héroïne « black Tar » qui prennent part au « skin-popping », un mode d'injection sous cutanée qui favorise le développement de *C. botulinum* directement dans les tissus (Passaro et al., 1998; Sobel, 2005).

Lorsque les BoNTs sont directement libérées dans la circulation générale depuis des tissus contaminés par *C. botulinum*, un faible contingent actif de bactéries pathogènes suffit à déclencher la maladie puisque la dose létale chez l'homme par voie intraveineuse est estimée à seulement 1ng/kg (Gill, 1982; Arnon et al., 2001; Rosow and Strober, 2015).

iii. Botulisme infantile et colonisation intestinale

Le botulisme infantile est une forme de la maladie qui affecte les enfants en bas âge de moins d'un an et qui n'a été identifiée que tardivement au milieu des années 70 (Arnon et al., 1977). Cette forme de botulisme est causée par la colonisation intestinale de *C. botulinum* et l'absorption de toxines botuliques produite *in situ*. Chez le nourrisson, l'immaturation de la flore intestinale est le principal facteur suspecté de favoriser le développement de *C. botulinum* (Sobel, 2005; Rosow and Strober, 2015). La toxi-infection qui en résulte est alors à l'origine d'un large spectre clinique, allant de l'hypotonie bénigne jusqu'à une combinaison de paralysies bilatérales des nerfs crâniens ou une paralysie flasque menaçant les fonctions respiratoires (Rosow and Strober, 2015). Aux USA, le botulisme infantile est principalement causé par des souches associées à la BoNT/A ou la BoNT/B, le

sérotype A provoquant généralement des manifestations cliniques plus sévères (Rosow and Strober, 2015).

La colonisation intestinale de *C. botulinum* peut également concerner l'adulte et déclencher le botulisme de la même façon que pour le botulisme infantile. Typiquement, ces patients présentent des anomalies anatomique ou fonctionnelles de l'intestin, ou bien consomment des antibiotiques qui peuvent favoriser le développement opportuniste de *C. botulinum* (Sobel, 2005).

iv. Autres formes : botulisme iatrogène et inhalatoire

Le botulisme peut aussi être provoqué de manière accidentelle suite à l'usage ou la manipulation des BoNTs. On parle alors de botulisme iatrogène lorsque des patients traités avec la BoNT à des fins thérapeutiques ou cosmétiques développent la maladie. En théorie les doses utilisées pour les applications cosmétiques sont trop faibles pour induire un syndrome systémique. Par contre, les plus fortes doses utilisées pour certaines applications thérapeutiques sont davantage susceptibles d'induire anecdotiquement des symptômes de botulisme systémique (Sobel, 2005).

Enfin, le botulisme peut survenir de manière non naturelle, par inhalation. Ce type de cas a notamment été décrit en 1962 dans un laboratoire allemand avec des symptômes s'apparentant à ceux du botulisme alimentaire (Sobel, 2005). Par ailleurs, le danger que représentent les aérosols de BoNTs en font une arme biologique potentielle prise en compte dans le cadre de la surveillance de la menace terroriste (Arnon et al., 2001; Zhang et al., 2010).

5. Applications thérapeutiques des toxines botuliques

a. Injections de toxines botuliques à visée thérapeutique

Outre les applications cosmétiques concernant principalement le traitement des rides d'expressions, les toxines botuliques sont employées comme agents thérapeutiques dans de nombreuses pathologies de la transmission cholinergique, corrigeant divers troubles liés à l'hypercontraction musculaire ou l'hypersécrétion glandulaire. Actuellement, seules les toxines botuliques de type A et B sont disponibles pour un usage clinique, et ce sous

plusieurs dénominations commerciales correspondant à différentes formulations. Botox® et Dysport® correspondent à deux formulations de BoNT/A en complexe avec des NAPs, alors que Xeomin® est une formulation de BoNT/A dépourvue de NAPs. Par contre, une seule formulation de BoNT/B en complexe existe sous le nom de Myobloc® aux USA, ou Neurobloc® en Europe (Abrams and Hallett, 2013; Kumar et al., 2016). La toxine botulique de type B a une durée d'action plus courte que celle de type A et provoque des manifestations dysautonomiques plus importantes (Dressler and Benecke, 2007).

Historiquement, les premières expérimentations de toxine botulique à visée thérapeutique chez l'homme ont été menées dans les années 70 par Alan Scott, un ophtalmologiste cherchant alors une alternative à la correction chirurgicale du strabisme (Erbguth, 2009). Après que la toxine botulique de type A ait été approuvée par l'agence américaine du médicament (FDA) pour le traitement du strabisme en 1989, d'autres affections cliniques ont été successivement ajoutées à la liste des indications approuvées par la FDA (Abrams and Hallett, 2013; Kim et al., 2015). Ainsi, les toxines botuliques représentent aujourd'hui une thérapie de premier ordre pour les patients souffrant de troubles liés à une hyperactivité cholinergique tels que les blépharospasmes ou les dystonies localisées. Elles sont aussi une option validée de traitement pour la spasticité résultant de traumatismes crâniens ou d'accidents vasculaires cérébraux. De plus, il a été montré que les injections de BoNTs sont efficaces pour atténuer l'hyperactivité du muscle detrusor de la vessie chez les patients incontinents, améliorer les troubles caractérisés par une hypersécrétion tels que l'hyperhydrose ou l'hypersialorrhée (Abrams and Hallett, 2013).

Dans les années à venir, le nombre d'applications cliniques des toxines botuliques devrait continuer à croître avec l'apport de nouvelles données précisant leur mode d'action ou dévoilant de nouveaux potentiels thérapeutiques. Par exemple, il a été décrit que l'action de la toxine botulique A peut persister indépendamment de la relaxation musculaire, ce qui suggère que cette toxine n'agit pas seulement sur les fibres cholinergiques motrices mais pourrait également moduler l'activité de fibres sensorielles ou du système autonome (Freund and Schwartz, 2003; Kim et al., 2015). Les effets analgésiques de la toxine botulique A ont d'ailleurs été décrits pour d'autres types de douleurs chroniques comme les migraines ou autres troubles neuropathiques qui ne sont pas directement liés à l'hyperactivité musculaire (Argoff, 2002; Kim et al., 2015). Actuellement, le mode d'action de la BoNT/A sur la nociception continue d'alimenter les débats. Selon les principales hypothèses, ces effets

seraient dus à un blocage de l'exocytose de VSs contenant certains neurotransmetteurs ou médiateurs inflammatoires, ou bien de l'exocytose de vésicules exprimant des récepteurs à la douleur, au niveau des neurones périphériques (Kim et al., 2015; Kumar et al., 2016).

D'autre part, des données indiquent que les BoNTs seraient transportées depuis le système périphérique vers des terminaisons nerveuses sensorielles au niveau central où leur effet neuromodulateur pourrait atténuer le traitement des signaux de la douleur (Kumar et al., 2016). Toutefois, cette hypothèse d'effets pharmacologiques centraux des BoNTs est encore très controversée (Kim et al., 2015).

En somme, bien que l'ensemble des mécanismes sous tendant l'action anti-nociceptive des toxines botuliques ne sont pas complètement connus, ces toxines et particulièrement les sérotypes A et B, font l'objet de nombreux travaux visant à mieux définir leur potentiel en tant que substances analgésiques (Argoff, 2002; Kim et al., 2015).

b. Vaccination contre le botulisme

Historiquement, la vaccination contre le botulisme a été développée pour les personnes considérées « à risques » et consistait en l'injection d'une formulation pentavalente de toxoïdes, correspondant au mélange des BoNTs A, B, C, D et E rendues inactives par un traitement chimique à la formaline (Rusnak and Smith, 2009). En 2011 et après une cinquantaine d'années d'utilisation, l'administration de cette formule a été interrompue à l'initiative du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) en raison d'un déclin de son immunogénicité et des effets secondaires indésirables qui y étaient associés.

La recherche de nouveaux vaccins s'est alors orientée vers l'amélioration des formulations de toxoïdes mais aussi vers de nouveaux candidats avec les vaccins recombinants (Rusnak and Smith, 2009). Bien que les vaccins développés à partir de toxoïdes puissent être efficaces et médicalement sûrs, leur procédé de fabrication qui requiert la production à grande échelle de BoNTs et les installations sécurisées adaptées est en revanche très coûteux (Rusnak and Smith, 2009; Ben David et al., 2015). Par conséquent, les efforts pour développer de nouveaux vaccins se concentrent principalement sur les sous-unités HC recombinantes des BoNTs qui ne sont pas toxiques en elles-mêmes. Parmi ces nouveaux vaccins recombinants, le rBV A/B (recombinant botulinum vaccine A/B) composé des fragments HC/A et HC/B paraît particulièrement prometteur (Ben David et al., 2015).

Enfin, d'autres stratégies sont encore développées, comme l'expression de domaines immunogènes des BoNTs par un virus dérivé de l'Influenza virus, couplée à une voie d'administration intranasale (Li et al., 2015).

c. Développement de neurotoxines recombinantes

La structure tripartite des BoNTs, avec des domaines fonctionnels permettant respectivement la reconnaissance neuronale, la translocation cytoplasmique et l'activité enzymatique intracellulaire, offre de multiples potentialités en termes d'applications thérapeutiques. Cette organisation modulaire ainsi que la déclinaison de propriétés fonctionnelles retrouvées naturellement dans les différents sérotypes, en ont fait des molécules de choix pour la conception de nouvelles protéines biologiquement actives. Ainsi, la conception de nouvelles BoNTs recombinantes constitue une stratégie de choix pour potentialiser leur activité biologique naturelle, étendre leur action à de nouvelles cellules cibles, ou encore développer des vecteurs d'adressage neuronal (Masuyer et al., 2014).

i. BoNTs hybrides et potentialisation de l'activité biologique

Les différences d'activité biologique observées entre les différents sérotypes, comme leur vitesse d'entrée dans les neurones ou leurs durées d'action, ont inspiré certains auteurs pour créer des BoNTs chimériques. En combinant des domaines fonctionnels provenant de sérotypes distincts, l'activité biologique des BoNTs peut alors être significativement modifiée, ce qui permet notamment de révéler les propriétés biologiques attribuables aux différents domaines fonctionnels (Wang et al., 2008). Comme exemple, on peut citer la LC(E)-BoTIM(A), BoNT hybride formée par la fusion de la LC de BoNT/E avec un mutant de BoNT/A dont la partie LC a été rendu inactive (Wang et al., 2011). De manière intéressante, cette BoNT artificielle combine la longévité d'action de la BoNT/A avec l'efficacité de blocage de la BoNT/E. De plus, contrairement à la BoNT/E, la LC(E)-BoTIM(A) est capable de bloquer des neurones sensoriels. De telles améliorations des propriétés biologiques des BoNTs sont particulièrement intéressantes pour le développement de nouveaux traitements thérapeutiques par exemple contre les douleurs chroniques.

Dans une autre étude, ces mêmes auteurs ont échangé les domaines H_C des BoNTs A et B (Wang et al., 2012). Pour une chimère AB, correspondant à la fusion du domaine H_C/B

avec les domaines LC et H_N de la BoNT/A, ils ont observés chez la souris une paralysie plus persistante que pour la BoNT/A. Cette durée d'action accrue pourrait s'expliquer par une plus forte expression de récepteurs de la BoNT/B comparé à ceux de la BoNT/A, conduisant à une internalisation plus importante de LC/A dans le cas de la chimère AB.

ii. Extension de l'action des BoNTs aux cellules non neuronales

En raison de leur grande spécificité d'adressage, les BoNTs exercent un clivage des protéines SNAREs limité aux neurones accessibles, soit principalement les neurones cholinergiques périphériques. Toutefois, les SNAREs sont des protéines ubiquitaires qui sont impliquées dans les processus de fusion membranaire de toutes les cellules eucaryotes (Südhof and Rothman, 2009). Par conséquent, certains isoformes de SNAREs exprimés dans des cellules non neuronales sont susceptibles d'être clivés par des BoNTs qui parviendraient à atteindre leur cytosol. Ainsi, les stratégies visant à rediriger les LCs des BoNTs vers des cellules non neuronales présentent un fort potentiel thérapeutique (Masuyer et al., 2014). En particulier, le développement de protéines artificielles capables d'inhiber de manière spécifique la sécrétion SNARE-dépendante de certaines cellules est d'un intérêt certain pour des perspectives de traitements des troubles de l'hypersécrétion.

Des résultats prometteurs ont d'ailleurs été obtenus avec un type de molécules artificielles combinant les domaines LC et H_N (LHn) des BoNTs et un ligand d'adressage spécifique. Par exemple, la partie (LHn) de la BoNT/C a été fusionnée à l'EGF (Epidermal Growth Factor) pour donner une protéine recombinante capable d'inhiber la sécrétion de mucine dans une lignée de cellules épithéliale pulmonaire humaine (Foster et al., 2006). Cette molécule aurait le potentiel de prévenir l'hypersécrétion de mucus dans des maladies comme l'asthme ou autres obstructions chroniques des voies respiratoires.

Sur le même principe, une protéine chimérique composée de la partie LHn de la BoNT/D couplée à la GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) a été désignée et produite (Somm et al., 2012) (**Figure 17**) dans le but de traiter l'acromégalie, une maladie endocrine caractérisée par une hypersécrétion de GH (Growth Hormone) par l'hypophyse. Des résultats particulièrement encourageants ont été obtenus *in vivo* avec de jeunes rats avec une inhibition dose-dépendante de la sécrétion de GH associée à une correction de l'excès de croissance chez les animaux.

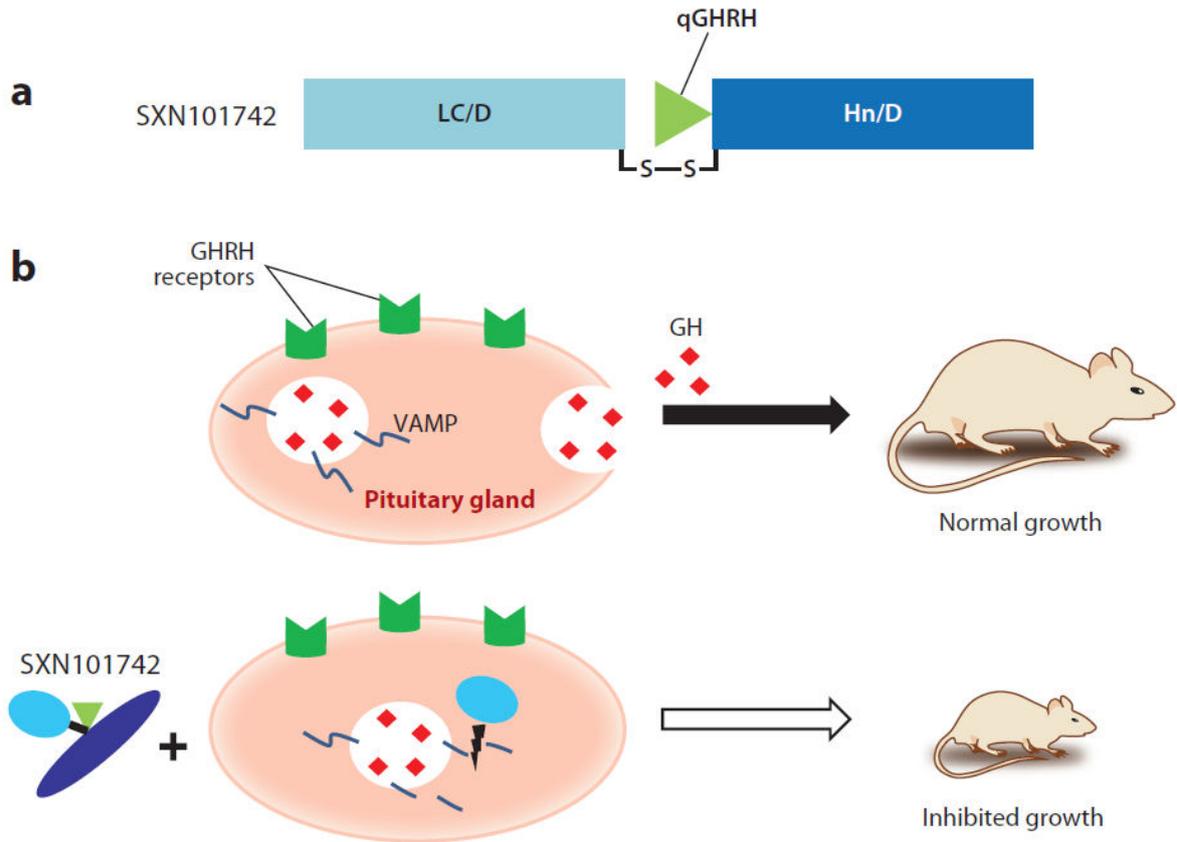


Figure 17 : Inhibiteurs de sécrétion adressés dans les cellules somatotrophes de l'hypophyse. (a) La molécule SXN101742 correspond au couplage de domaines fonctionnels de la BoNT/D (LC/D et Hn/D) avec le polypeptide 1-40 dérivée de la GHRH (qGHRH). (b) Le rôle de la molécule SXN101742 est d'inhiber la sécrétion de GH dans les cellules hypophysaires. Le polypeptide qGHRH permet la liaison spécifique de la molécule chimérique sur les récepteurs (GHRH receptors) exprimés à la surface de ces cellules. Une fois la molécule internalisée, la partie LC/D clive la VAMP ce qui entrave la libération de GH et restreint en conséquence la croissance des animaux (d'après Masuyer et al. 2014).

iii. Modification de spécificité du substrat

Le développement de thérapies basées sur l'action des LCs dans des cellules non neuronales peut se heurter au problème de la non-reconnaissance de certains isoformes de SNAREs non neuronaux. De ce fait, les stratégies visant à cibler les SNAREs des cellules non neuronales peuvent être considérablement élargies par une modification de la spécificité envers le substrat (Masuyer et al., 2014). En modifiant la séquence des domaines LCs, certains auteurs sont parvenus à augmenter le nombre ou à changer la nature de leurs cibles respectives, permettant notamment le clivage de SNAREs non neuronales.

Par exemple, il a été décrit qu'une mutation de LC/E (K224D) autorise un clivage supplémentaire de l'isoforme non neuronale SNAP23, tout en conservant celui de la SNAP25 qui constitue le substrat naturel (Chen and Barbieri, 2009). Dans la même étude, les auteurs ont montré que l'adressage spécifique de cette LC/E mutée dans des cellules épithéliales humaines provoque un clivage de la SNAP23 endogène responsable de l'inhibition de la sécrétion de mucine et d'IL-8. Ce résultat illustre bien le potentiel thérapeutique des LCs génétiquement modifiées pour le traitement de diverses pathologies caractérisées par une hypersécrétion cellulaire.

iv. Utilisation des toxines botuliques comme vecteur d'adressage neuronal

En dehors du clivage enzymatique des protéines SNAREs, la remarquable neurospécificité des BoNTs représente aussi une source d'applications thérapeutiques pour le développement de transporteurs neuronaux. Ainsi, des protéines de fusion utilisant le domaine HC des BoNTs ont été élaborées dans le but de délivrer des drogues de manière spécifique dans les neurones.

Au début des années 2000, un groupe a caractérisé ce nouveau type de vecteur neuronal en couplant différentes enzymes à la BoNT/D entière (Bade et al., 2004). Ces auteurs ont notamment mis en évidence la nécessité d'un dépliement partiel des protéines cargo pour permettre leur translocation cytoplasmique. Plus récemment, d'autres auteurs ont fusionné le domaine de liaison de la BoNT/A à la streptavidine afin de transporter dans les neurones des virus non-toxiques biotinylés exprimant des gènes thérapeutiques, ce qui constitue une nouvelle approche pour le traitement de pathologies neuromusculaires telle la

sclérose latérale amyotrophique (Drachman et al., 2010). Enfin les BoNTs peuvent aussi être mutées au niveau de leur domaine LC afin de produire des transporteurs neuronaux empruntant la même voie d'entrée que les BoNT sauvages pour délivrer des molécules d'intérêt (Vazquez-Cintron et al., 2014).

II. Complexité du mode de liaison des neurotoxines botuliques

Les récepteurs des BoNTs ont été identifiés tardivement, et ce après l'identification de leurs cibles intracellulaire. Après que les gangliosides aient été proposés comme récepteurs au début des années 1970, l'utilisation de BoNTs radiomarquées a ensuite permis de caractériser des sites de liaisons sur des préparations neuronales, pour aboutir à l'idée qu'il existe deux récepteurs de nature gangliosidique et protéique. Cependant, bien que ce concept de double récepteur ait été validé et que plusieurs récepteurs aient été identifiés, le modèle actuel de liaison des BoNTs n'est pas complètement établi.

Les BoNT/A, B et E représentant les principales causes du botulisme chez l'homme, je me suis intéressé dans le cadre de ma thèse à la liaison de ces trois sérotypes sur leurs récepteurs avec un intérêt particulier porté sur la BoNT/B.

1. Les gangliosides

a. Structure, biosynthèse et fonctions

i. Structure et biosynthèse

Les gangliosides sont des lipides complexes représentant une catégorie de glycolipides, molécules composées d'au moins un résidu glucidique relié à une structure lipidique hydrophobe par une liaison glycosidique. Ce sont plus précisément des glycosphingolipides syalilés dont la partie lipidique est constituée par une base sphingoïde ou céramide. La grande majorité des gangliosides (à l'exception du GM4) ont pour base structurale commune une molécule de lactosylcéramide (Lac-Cer), correspondant à l'ajout du lactose (association de glucose et de galactose) sur une molécule lipidique de type céramide. Sur cette base de Lac-Cer d'autres résidus osidiques peuvent se greffer : un résidu d'N-acétylgalactosamine au contact du galactose, et un second résidu galactose supplémentaire au bout de l'arborisation comme illustré sur la **figure 18** pour le ganglioside GM1.

En outre, la caractéristique qui définit les gangliosides parmi les glycosphingolipides est la présence d'un ou plusieurs résidus d'acide sialique (ou acide N-acetylneuraminique,

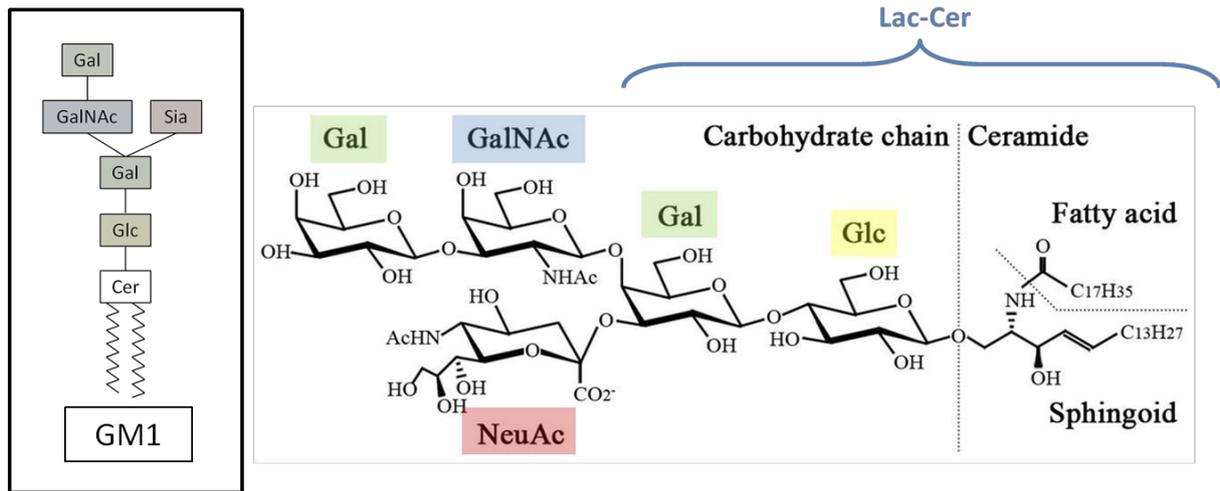


Figure 18 : Schéma de la structure du ganglioside GM1. A gauche, les résidus osidiques constituant le GM1 sont représentés par des rectangles de couleur : glucose (Glc, jaune), galactose (Gal, vert), N-acetylgalactosamine (GalNAc, bleu), N-acétylneuraminique (Neu5Ac, rose). Le ceramide (Cer) est représenté par un rectangle blanc avec les chaînes d'acide gras figurées par des lignes en dent de scie verticales. A droite, la structure détaillée de la molécule avec chacun des éléments de la portion osidique représentés selon la représentation conformationnelle de Reeves (d'après Yu et al. 2011).

Neu5Ac) (Yu, K Robert et al., 2011). Selon le nombre de résidus Neu5Ac portés, les gangliosides sont dits mono- (GMx), di-(GDx) ou tri- (GTx) ou même quadri-sialylés (GQx) : par exemple, les gangliosides GM1, GM2, GM3 sont tous monosialylés alors que le GD1a et le GT1b sont respectivement di- et tri-sialylés (**Figure 19**). Ainsi, dans la nomenclature des gangliosides, le numéro qui suit la lettre majuscule (M, D ou T) est déterminé en fonction du nombre d'oses constituant de l'arborisation osidique (en dehors des résidus Neu5Ac) : la configuration minimale du lactosylcéramide correspond au chiffre 3, l'ajout d'un résidu N-acétylgalactosamine (GalNAc) qui donne une arborisation à trois molécules osidiques correspond au chiffre 2 et le chiffre 1 concerne les arborisations à quatre oses où un second résidu de galactose est incorporé (**Figure 19**). Enfin, la lettre minuscule (a ou b) suivant ce numéro fait référence à la voie de synthèse (**Figure 19**).

Comme d'autres glycosphingolipides, la synthèse des gangliosides est initiée dans le réticulum endoplasmique puis poursuivie dans l'appareil de Golgi où les résidus osidiques sont greffés à la structure lipidique (Maccioni, 2007). Plusieurs enzymes de type glycosyltransférase interviennent alors dans une séquence propre à la synthèse de chaque ganglioside afin de greffer les résidus Neu5Ac, Galactose, ou N-acétylgalactosamine qui composent la partie osidique. A partir d'une structure Lac-Cer, l'ajout d'un premier résidu Neu5Ac donne le GM3 qui représente le carrefour entre deux voies de synthèse, soient la série « a » et la série « b » (**Figure 19**). Il existe aussi la série « c » dérivée du GD3 et la série « asialo » dérivée en amont de Lac-Cer, qui donnent toutes deux d'autres isoformes de gangliosides (Yu, K Robert et al., 2011).

ii. Fonctions des gangliosides

L'importance biologique des gangliosides se reflète au travers de leur expression ubiquitaire dans les différents tissus et fluides de l'organisme (Yu et al., 2008). Ces glycolipides que l'on retrouve principalement dans le feuillet externe des membranes plasmiques, sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires liées aux processus d'adhérence et de reconnaissance intercellulaire (Yu, K Robert et al., 2011). A l'instar d'autres composants membranaires tels que les sphingolipides ou le cholestérol, les gangliosides participent également à la transduction de signaux depuis les micro-domaines membranaires spécialisés comme les radeaux lipidiques (Simons and Toomre, 2000),

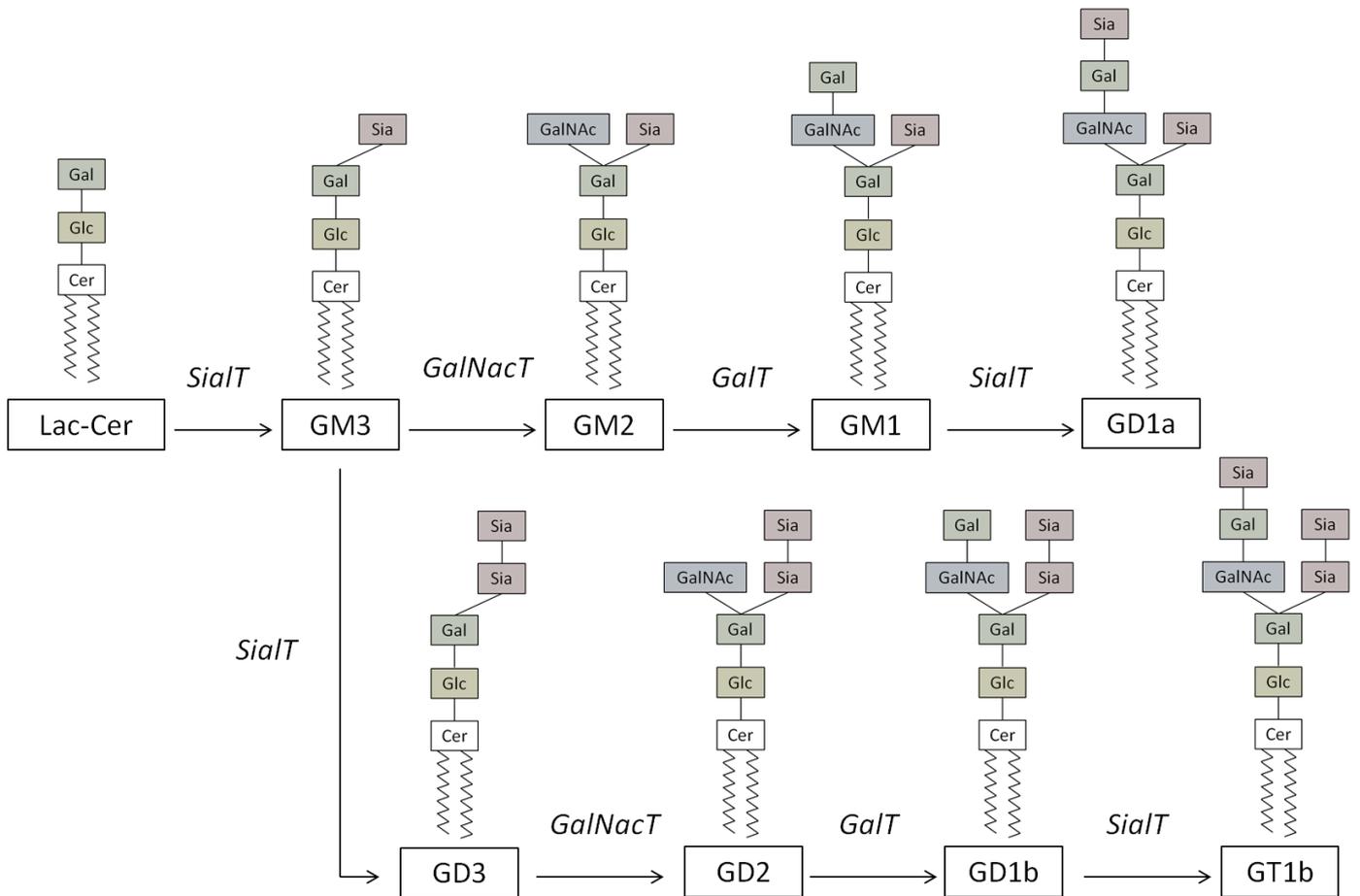


Figure 19 : Schéma simplifié des voies de biosynthèses des gangliosides. La première étape consiste en l'ajout d'un résidu d'acide sialique (Sia) sur le précurseur lactosyléramide (Lac-Cer), via une première sialyltransférase (*SialT*) pour former le GM3. A partir de ce ganglioside simple, l'intervention d'une seconde *SialT* donne le GD3 et celle de N- acetylgalactosaminyltransferase (*GalNAcT*) donne le GM2 après la greffe d'un résidu N-acétylgalactosamine (GalNAc). A partir du GM2, les gangliosides GM1 puis GD1a sont obtenus par les actions successives et séquentielles d'une GalactosylTransferase (*GalT*) et d'une seconde *SialT*, ce qui correspond à la voie « a ». A partir du GD3, les gangliosides GD2, GD1b et enfin GT1b sont obtenus selon la séquence enzymatique de la voie « b ». Les différents types d'enzymes sont indiqués en italique au dessus de chacune des flèches de réaction et regroupent des enzymes distinctes sous un même nom générique (*SialT*, *GalT*, *GalNAcT*). Les noms des différents glycolipides sont indiquées encadrés en dessous d'un schéma de leur structure : les chaines d'acides gras du Ceramide (Cer, rectangle blanc) sont représentées par des lignes verticales en dent de scie ; les résidus glucose (Glc, jaune), galactose (Gal, vert), N-acétylgalactosamine (GalNAc, bleu) et acide sialique (Sia, rouge) sont représentés par des rectangle de couleur et les liaisons par des lignes droites (verticales ou obliques).

les cavéoles (Anderson, 1998) ou autres domaines enrichis en glycosphingolipides.

Les gangliosides sont principalement présents dans les feuillettes externes des cellules et particulièrement abondants dans le système nerveux et notamment dans le cerveau où ils représentent environ 4% des lipides (Sonnino et al., 2006). Parmi les 188 types de gangliosides identifiés, seulement 4 (GM1, GD1a, GD1b et GT1b) représentent 97% des gangliosides cérébraux chez l'adulte (Yu et al., 2008; Schnaar et al., 2014).

Du fait que les gangliosides soient particulièrement abondants au sein du système nerveux, les déficiences causées par différentes invalidations géniques (KO) opérées chez la souris, ont permis de mettre en lumière l'importance de ces glycolipides. Ainsi, l'invalidation de gènes codant pour certains enzymes des voies de biosynthèses des gangliosides a des répercussions phénotypiques variables selon l'enzyme ciblé. Par exemple, il a été décrit que des souris KO pour le gène de la SiaT permettant la synthèse du GM3 à partir du Lac-Cer présentent une dégénérescence de l'organe sensoriel de la cochlée, s'accompagnant d'une totale surdité (Yoshikawa et al., 2009). Dans un autre modèle de souris où l'enzyme GalNAcT n'est plus exprimée, les animaux qui ne peuvent alors synthétiser que des gangliosides simples (GM3 et GD3) développent des défauts de myélinisation ainsi qu'une dégénérescence axonale au niveau central et périphérique (Sheikh et al., 1999). L'abolition globale d'expression des gangliosides (en associant l'invalidation d'une SiaT et d'une GalNAcT) conduit là encore à une dégénération axonale et des troubles critiques d'interactions entre les axones et les cellules gliales dans le système nerveux central (SNC) ce qui provoque une mort prématurée chez ces animaux (Yamashita et al., 2005). En somme, il est aujourd'hui bien admis que les gangliosides sont impliqués dans le neurodéveloppement, le maintien de l'intégrité neuronale mais aussi dans la mémoire ou la neuroplasticité (Palmano et al., 2015; Schengrund, 2015).

Parmi les nombreuses fonctions que remplissent les gangliosides au sein du système nerveux, il est bien établi que ces lipides régulent certains récepteurs membranaires, dont notamment les récepteurs de type tyrosine kinase (Schnaar, 2016). L'influence des gangliosides est alors due à des interactions spécifiques avec les récepteurs, ou passe par des effets indirects modulant les propriétés physiques de la membrane. Par exemple, il a été décrit que le GD1a potentialise l'activation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) en améliorant l'affinité pour le ligand et en favorisant la dimérisation (Liu et al., 2004). De façon similaire, le GM1 potentialise l'activation et la dimérisation du récepteur au NGF

(Nerve Growth Factor) TrkA (Farooqui et al., 1997; Schnaar, 2016). Le GT1b semble impliqué dans la pousse neuritique en interagissant avec la Myelin Associated Protein (MAG). En effet, dans des cultures de cellules d'hippocampe, des anticorps dirigés contre le GT1b miment l'effet de MAG et inhibent la pousse des neurites à l'encontre d'anticorps reconnaissant le GD1a ou GM1 (Vinson et al., 2001). Enfin, le GM1 peut interagir directement avec le récepteur à la sérotonine (SERT1A) pour moduler la conformation d'une boucle extracellulaire, ce qui peut être déterminant pour la liaison du ligand et la fonction du récepteur (Prasanna et al., 2016).

b. Co-récepteurs des toxines botuliques

i. Implication dans la liaison des toxines botuliques

Au début des années 70, il a été mis en évidence que la pré-incubation de la BoNT/A avec différents gangliosides est responsable d'une diminution de sa toxicité que ce soit dans des expériences *in vivo* chez la souris ou *in vitro* sur des préparations de nerf phrénique de diaphragme (Simpson and Rapport, 1971). Parmi les gangliosides, le GT1b possède la plus forte capacité de détoxification, et ce devant le GQ1b, le GD1b, le GD1a, le GT1a et enfin les gangliosides mono-sialylés selon un ordre d'efficacité décroissant (Simpson and Rapport, 1971; Kitamura et al., 1980). Le GT1b est également capable d'inhiber l'effet des BoNT/B, C, D, E et F chez la souris (Kozaki et al., 1984). Ces premiers résultats ont suggéré que les gangliosides, et notamment le GT1b, inhibent l'action des BoNTs par un phénomène de compétition entravant directement leur liaison, constituant ainsi une preuve de l'implication des gangliosides neuronaux en tant que récepteurs des BoNTs.

L'examen de la liaison directe des différents sérotypes de BoNTs sur des gangliosides séparés par chromatographie en couche mince, a révélé que la BoNT/A comme la BoNT/B ne peuvent lier que certains gangliosides : le GQ1b, le GT1b, le GD1a pour la BoNT/A et le GT1b, le GD1b, le GD1a pour la BoNT/B selon un ordre d'importance décroissant (Takamizawa et al., 1986; Ochanda et al., 1986). A travers plusieurs études, les interactions observées entre les sérotypes de BoNTs et les différents gangliosides ont alors pu être recensées (**Tableau 4**). Cependant, la liaison des BoNTs sur ces gangliosides est fortement dépendante de la force ionique du milieu d'incubation. Ainsi, dans des conditions où la force ionique est physiologique, la liaison de BoNT/A et BoNT/B sur le GT1b est complètement perdue

BoNT /(Serotype)	Bound gangliosides
A	GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b
B	GD1a, GD1b, GT1b
C	GD1a, GD1b, GT1b
D	GT1b
E	GD1a, GT1b, GQ1b
F	GD1a, GD1b GT1b
G	<i>not needed</i>

Tableau 4 : Les différents types de gangliosides liés par chacun des sérotypes de toxines botuliques (d'après Yowler & Schengrund 2004).

(Ochanda et al., 1986; Takamizawa et al., 1986). Ces résultats révèlent que la force ionique est un facteur déterminant pour l'interaction des BoNTs avec les gangliosides *in vitro*, suggérant que de telles interactions directes ne sont pas favorisées *in vivo*. Il a d'ailleurs été montré que l'activité biologique de la BoNT/A n'est pas affectée par la pré-incubation avec le GT1b dans un tampon de liaison contenant 150 mM NaCl (Kozaki et al., 1984).

Par la suite, L'affinité de la BoNT/A pour le GT1b incorporé dans des liposomes a pu être mesurée par la technique de SPR (Surface Plasmon Resonance) dans un tampon de force ionique physiologique. Cependant, la valeur d'affinité rapportée est de $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ et a été calculée en utilisant un modèle de liaison intégrant un changement de conformation de la BoNT/A (Yowler and Schengrund, 2004a). Cette valeur d'affinité est à prendre avec précaution car des données cristallographiques indiquent que la BoNT/A ne change pas de conformation en liant le GT1b (Stenmark et al., 2008).

Au niveau cellulaire, il a été montré que le traitement par la neuraminidase, glycosidase hydrolysant la liaison osidique des résidus N-Acétylneuraminique (Neu5Ac), inhibe la liaison des BoNTs alors que dans certaines lignées résistantes à l'action des BoNT, l'ajout exogène de GT1b rendait ces cellules sensibles aux BoNTs (Marxen et al., 1989). L'effet de la neuraminidase qui montre l'importance des résidus NeuAc pour la liaison des BoNTs sur les gangliosides, a également été observée sur des préparations de synaptosomes (Habermann and Heller, 1975; Kozaki et al., 1984). Par ailleurs, une étude employant des souris KO dépourvues de GM2/GD3 synthase (ou GalNAcT), a révélé que l'absence de gangliosides complexes diminuait la toxicité de la BoNT/A comme de la BoNT/B (Kitamura et al., 1999). En complément, une autre étude a souligné l'importance des gangliosides complexes dans la liaison des BoNTs, en montrant que la BoNT/A ne bloque pas la libération d'ACh dans des préparations d'hemi-diaphragme issues des mêmes souris KO (Bullens et al., 2002).

L'ensemble de ces résultats montre sans ambiguïté que les gangliosides et leurs résidus Neu5Ac sont impliqués dans le mécanisme de liaison des BoNT, ce qui a été confirmé ultérieurement par des données structurales du complexe BoNT/ganglioside. Cependant, l'absence de lien direct entre la capacité de détoxification des gangliosides et leur capacité limitée à lier les BoNTs suggère un rôle plus subtil de ces récepteurs lipidiques dans le mécanisme de liaison des BoNTs.

ii. Etude structurale des interactions BoNT-ganglioside

Les BoNTs abritent au sein de leur domaine H_{CC} au moins un site de liaison pour les gangliosides (Rummel et al., 2003, 2009). L'analyse cristallographique de différents domaines H_{CC}, en complexe avec des analogues de GT1b ou de GD1a, a mis en lumière l'importance d'un motif Ser-x-Trp-Tyr (SxWY) où x est un acide aminé quelconque, lequel est conservé chez la BoNT/A, B, E, F, G et la toxine tétanique (TeNT) (Kammerer and Benoit, 2014). Ainsi, il a été décrit pour le domaine H_{CC} de la BoNT/A que le résidu Trp₁₂₆₆ de ce motif représente un élément central du site de liaison, interagissant à la fois avec les résidus Gal4 et GalNAc3 du GD1a par stacking hydrophobe et avec le résidu Sia6 par le biais d'une liaison hydrogène (**Figure 20**). Le résidu Tyr₁₂₆₇ étend alors l'environnement hydrophobe de la poche de liaison formée par Trp₁₂₆₆ et le résidu Ser₁₂₆₄ contracte une liaison hydrogène avec le Gal4 du GD1a. Outre le motif SxWY, d'autres résidus de BoNT/A prennent part à la liaison du ganglioside en engageant plusieurs liaisons hydrogène et ce, notamment vers les résidus osidiques terminaux Gal4, GalNAc3, Sia5 et 6 (**Figure 20**).

Pour la BoNT/B, des interactions similaires ont été décrites entre la partie H_{CC} et le GT1b bien que les positions relatives des résidus osidiques du ganglioside présentent des variations significatives (à l'exception du résidu Gal4) en comparaison de la liaison avec la BoNT/A (Berntsson et al., 2013). Le fait que les mutants Trp₁₂₆₆Leu pour H_{CC}/A et Trp₁₂₆₂Leu pour H_{CC}/B ne soient plus capables de former de complexe avec le GT1b confirme le rôle crucial du tryptophane du motif SxWY pour le site de liaison aux gangliosides (Rummel et al., 2003).

Concernant les gangliosides, le résidu Sia5 (**Figure 20**) retrouvé dans la structure du GT1b et du GD1a constitue un important point d'ancrage pour la BoNT/B en formant de multiples interactions clefs avec les résidus du site de liaison (Berntsson et al., 2013). A l'inverse, l'absence de Sia5 dans la structure du GD1b et du GM1 peut expliquer une moindre affinité de ces gangliosides pour les BoNTs. D'autre part, certains résidus de BoNT/B comme la Lys₁₂₆₅ et l'Arg₁₂₆₉ sont susceptibles d'interagir avec le résidu Sia7 du GT1b, lequel fait défaut au GD1a. Des interactions supplémentaires mobilisant le Sia7 pourraient alors expliquer la supériorité du GT1b en termes d'affinité (Berntsson et al., 2013).

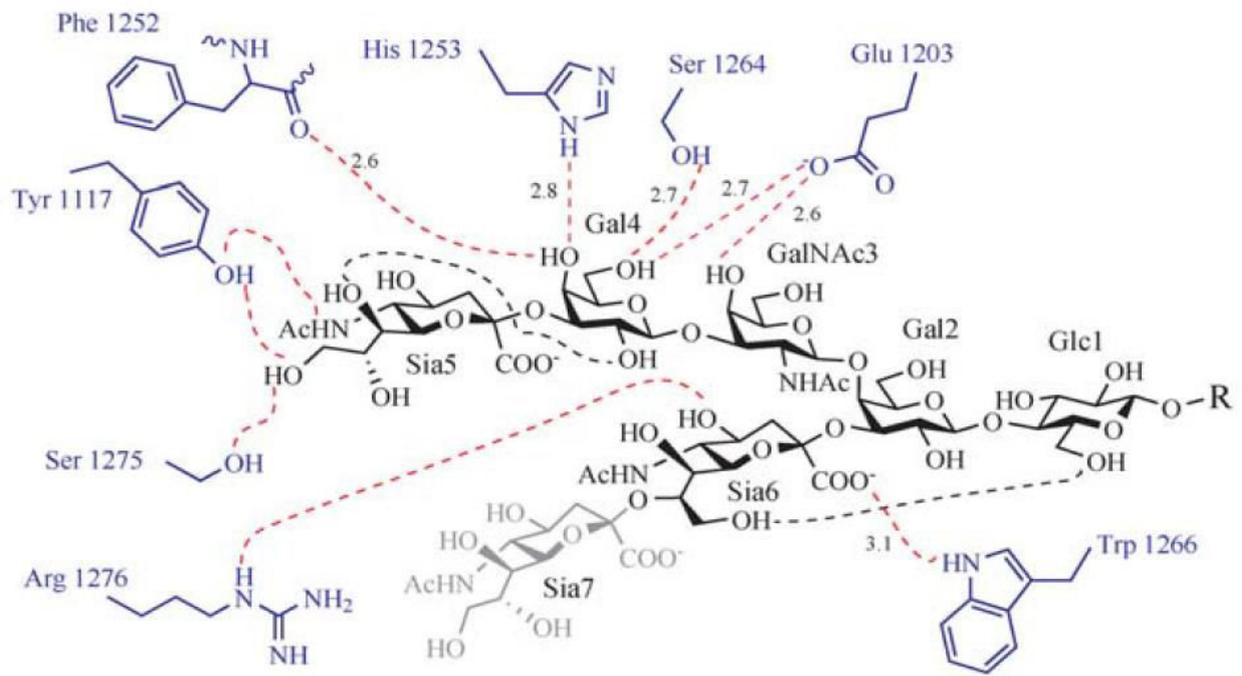


Figure 20 : Schéma d'interaction entre la BoNT/A et un analogue du GT1b. Les liaisons hydrogènes entre la toxine (bleue) et l'analogue GT1b (noir) sont représentées par des lignes de tirets rouges et les liaisons hydrogènes du GT1b par des lignes de tirets noirs. Les valeurs numériques indiquées sur les lignes pointillées rouge correspondent, en Å, aux distances (pas à l'échelle) séparant les résidus et correspondant aux principales liaisons hydrogènes. Le résidu d'acide sialique (Sia7) au sein du complexe, est représenté estompé (d'après Stenmark et al. 2008).

Enfin, de manière intéressante, la comparaison de structure des formes libre et complexée de H_{CC}/A et H_{CC}/B indique que la liaison aux gangliosides n'induit pas de changements majeurs de conformation (Stenmark et al., 2008; Berntsson et al., 2013).

2. Récepteurs protéiques des toxines botuliques

Dans les années 1980 l'implication d'un récepteur protéique dans la liaison des BoNTs a été mise en évidence. En effet il était observé que la liaison de la BoNT/A comme celle de la BoNT/B sur des synaptosomes de cerveau de rat diminuait de façon conséquente lorsque les préparations subcellulaires étaient traitées avec des protéases (Evans 1986, Williams 1983). Alors qu'une récupération partielle de la liaison de BoNT/B se produit après l'ajout exogène de GT1b ou GD1a sur les synaptosomes pré-traités avec la neuraminidase, l'ajout de gangliosides ne restaure pas cette liaison si les synaptosomes sont pré-traités avec la lysyl-endopeptidase (Ogasawara et al., 1991). Ces résultats suggéraient que la BoNT/A et la BoNT/B se liaient aux membranes neuronales selon un mode de liaison faisant intervenir les gangliosides en coopération avec une protéine membranaire.

a. Synaptotagmines

i. *Structure et propriétés*

Les synaptotagmines (SYTs) sont une famille de protéines possédant un seul segment transmembranaire et deux domaines C2 (C2A et C2B) capables pour la majorité d'entre elles de lier les ions Ca²⁺ (von Poser et al., 1997; Sugita et al., 2002). Ces domaines en tandem, homologues au domaine de régulation C2 de la protéine kinase C (PKC), constituent la majeure partie C-terminale de la protéine (**Fig 21**). Les domaines C2, riches en feuilletts β, sont retrouvés dans de nombreuses protéines. Ils sont connus pour lier les ions Ca²⁺ et confèrent à certaines protéines des propriétés d'interaction avec les phospholipides. Plusieurs isoformes sont impliquées dans les mécanismes d'exocytose et interagissent avec les phospholipides d'une manière calcium dépendante (Pinheiro et al., 2016).

On recense actuellement 17 isoformes de SYTs chez l'homme (SYT1-17), la SYT1 étant jusqu'à présent la mieux caractérisée, notamment pour son rôle dans la fusion des VSs (Chapman, 2008). La SYT1 est une protéine de 65kDa (initialement nommée p65) qui a été

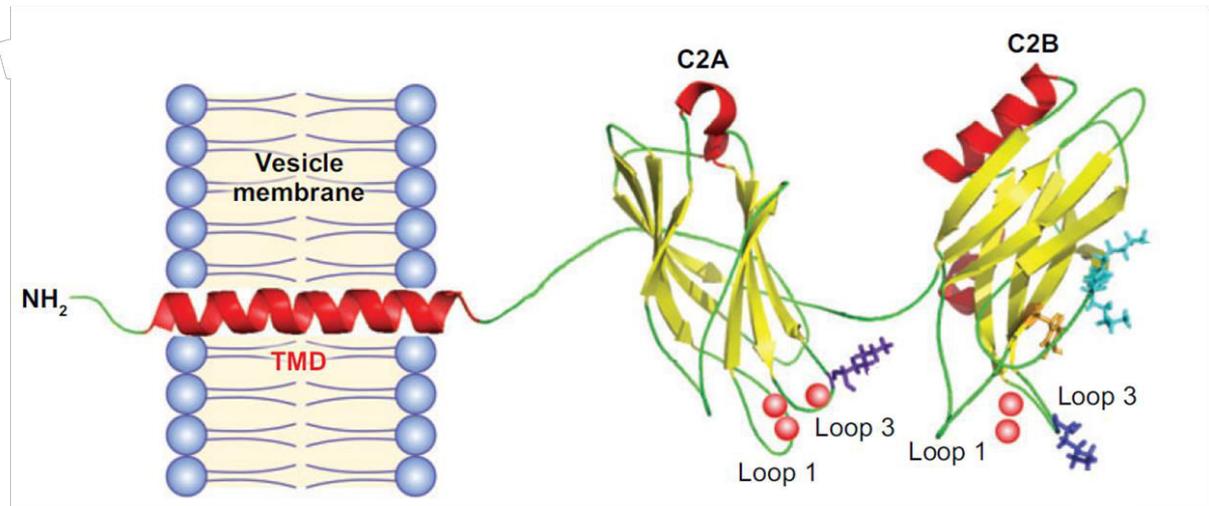


Figure 21 : La structure de la synaptotagmine 1 (SYT1) de rat. L'extrémité N-terminale (à gauche) est orientée dans la lumière de la vésicule synaptique. Après le segment transmembranaire (TMD), la partie C-terminale contient deux domaines C2 (C2A et C2B) capables de lier respectivement trois et deux ions Ca^{2+} (ronds rouges). Les chaînes latérales de plusieurs acides aminés importants pour la fonction de régulation de l'exocytose sont aussi représentées (d'après Chapman 2008).

identifiée dans les VSs et les VLCDs des cellules neuronales et neurosécrétrices (Matthew et al., 1981). Le nombre de copies de SYT est estimé à 20 par VS (Takamori et al., 2006).

Les synaptotagmine 1, 2 et 9 représentent les principaux senseurs calciques de l'exocytose neuronale (Pinheiro et al., 2016). Elles sont responsables de la libération synchrone de neurotransmetteurs et assurent un couplage rapide entre la dépolarisation et la libération des neurotransmetteurs au niveau central mais aussi au niveau de la JNM. La SYT2 est l'isoforme la plus proche de la SYT1 en termes d'homologie de séquence et remplit certaines fonctions comparables à celles de la SYT1 au sein du neurone. D'ailleurs il a été décrit que l'expression de SYT2 peut compenser une déficience de SYT1 (Nagy, 2006; Leitzell, 2007). Mis à part une co-expression dans le striatum, l'hypothalamus et l'hippocampe (Pang et al., 2006a), la SYT1 et la SYT2 ont une distribution complémentaire avec une dominance de la SYT2 dans les régions caudales (Geppert et al., 1994). La SYT2 est le principal senseur calcique de la libération synchrone au niveau du calyx de Held ainsi qu'à la jonction neuromusculaire (Pang et al., 2006b).

Dans le cas de la SYT1, on dénombre 5 sites de liaisons au Ca^{2+} répartis entre les domaines C2A (3 sites de liaisons) et C2B (2 sites de liaisons) (**Figure 21**). Dans les membranes vésiculaires, l'orientation des SYTs est telle que leur partie N-terminale est intraluminaire et leurs domaines C-terminaux cytosoliques. Par conséquent, lorsque la vésicule (SV ou VLCD) fusionne avec la membrane plasmique, la partie N-terminale se retrouve exposée au milieu extracellulaire.

De manière dépendante ou indépendante de la présence de Ca^{2+} , les SYTs sont capables de former des homo- et hétéro-oligomères et ont été classées pour cela en plusieurs groupes (Fukuda and Mikoshiba, 2000). Le groupe A (SYT3, SYT5, SYT6, SYT10) forme aussi bien des homo- que des hétéro-oligomères et ce, indépendamment du Ca^{2+} . Le groupe B (SYT1, SYT2, SYT8, SYT11) montre une propension plus modérée à former des homo-oligomères en l'absence de Ca^{2+} . Les SYTs du groupe C sont caractérisées par une moindre activité d'homo-oligomérisation dépendante du Ca^{2+} (SYT9) ou une absence d'oligomérisation et d'interaction avec les ions Ca^{2+} (SYT4). La SYT7 correspondant au groupe D présente des propriétés particulières d'homo-oligomérisation dépendante de la présence de Ca^{2+} .

La SYT1 comme la SYT2 sont à la fois N-glycosylées et O-glycosylées au niveau de leur domaine N-terminal (Han et al., 2004; Kanno and Fukuda, 2008). Elles sont également

phosphorylées par de multiples kinases au niveau de leur domaine cytosolique (Hilfiker et al., 1999) et palmytilées dans la région juxtamembranaire du domaine cytosolique (Prescott et al., 2009). Ces modifications post-traductionnelles leur donnent un poids moléculaire apparent de 65 kDa en gel d'électrophorèse alors que le poids théorique déduit de la séquence primaire de la SYT1 est de 45kDa. Enfin, la SYT peut s'associer au cholestérol (Rosa and Fratangeli, 2010) et est d'ailleurs retrouvé dans les radeaux lipidiques isolés à partir de cerveaux de rat (Gil et al., 2005). Aussi, il a été décrit que l'état de phosphorylation de la SYT régule l'association de son domaine transmembranaire avec les radeaux lipidiques (Lv et al., 2008).

ii. Fonctions de SYT1 et SYT2

Dans les neurones, la SYT1 et la SYT2 sont impliquées à la fois dans l'exocytose et dans l'endocytose des VSs et sont principalement connues pour réguler l'exocytose de type rapide via leur rôle de senseur calcique (Brose et al., 1992; Geppert et al., 1994; Harris and Littleton, 2015; Leitzell, 2007).

En prenant comme référentiel de temps l'arrivée du PA, la libération évoquée de neurotransmetteurs décrit deux phases : une phase synchrone de fusion des VSs qui intervient en quelques centaines de microsecondes, puis une composante asynchrone, plus lente, qui peut s'étendre sur des centaines de millisecondes selon le type de synapse (Kaeser and Regehr, 2014). En marge de la libération évoquée, il existe aussi des évènements de fusion qui interviennent indépendamment des PA et qui sont qualifiés de libérations spontanées (Kavalali, 2014).

Les SYTs s'associent à plusieurs partenaires comme les canaux calcium ou le complexe SNARE (Leveque et al., 1992, 2000). Ainsi, indépendamment de la présence de Ca^{2+} , la SYT1/2 peut lier la syntaxine (Chapman et al., 1995) et la SNAP25 (Schiavo et al., 1997) mais dans les deux cas le Ca^{2+} favorise ces interactions *in vitro*.

Dans le cas de la libération évoquée synchrone, l'entrée de calcium provoque un changement de conformation de la SYT1/2 permissif à la complétion de l'assemblage du complexe SNARE (Leveque et al., 2000) en déplaçant notamment la complexine, protéine responsable de l'inhibition de l'assemblage complet du complexe SNARE (Südhof and Rothman, 2009). En parallèle, les domaines C2A et C2B pénètrent dans la membrane

plasmique via une interaction Ca^{2+} -dépendante avec les phospholipides acides (Sutton et al., 1995; Zanetti et al., 2016). Ces deux mécanismes convergent alors vers la fusion des membranes plasmique et vésiculaire.

Outre l'importance de la SYT1/2 en tant que senseur calcique favorisant la libération synchrone, certaines données suggèrent un rôle de ces protéines dans la libération asynchrone (Kaeser and Regehr, 2014; Sun et al., 2007). En effet, des expériences réalisées avec la SYT1 chez la drosophile suggèrent que le domaine C2A serait dédié à la limitation de la libération asynchrone et que le rôle principal du domaine C2B serait de favoriser la libération synchrone des neurotransmetteurs (Harris and Littleton, 2015; Yoshihara et al., 2010). Dans ce système, l'existence d'un double mécanisme de régulation illustre à quel point ces SYTs sont importantes pour assurer la coordination des événements de libération synchrone.

Enfin, s'il est vrai que la SYT1 et la SYT2 jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'exocytose, elles sont aussi impliquées dans le mécanisme d'endocytose des VSs. Ainsi, la suppression de SYT1 (KO SYT1) entraîne une diminution de l'endocytose dans des conditions où l'exocytose est bloquée (Nicholson-Tomishima and Ryan, 2004; Schwarz, 2004). Par ailleurs, il a été mis en évidence que le domaine C2B de la SYT1 peut engager une double interaction avec deux sous-unités du complexe adaptateur AP-2, lequel est connu pour être impliqué dans le recrutement de cargo lors de l'endocytose clathrine dépendante (Haucke et al., 2000).

iii. SYT1 et SYT2 : récepteurs de la BoNT/B

Initialement, le groupe de S. Kozaki a purifié un récepteur protéique pour la BoNT/B, et ce, à partir de solubilisat de membranes natives de rat. Des indices comme le poids moléculaire, l'identité d'une portion de séquence primaire, ou encore les propriétés de reconnaissance des anticorps dirigés contre ce nouveau récepteur, indiquèrent qu'il s'agissait de la SYT (Nishiki et al., 1994).

Dans une seconde étude, les mêmes auteurs ont montré que SYT1 et SYT2, reconstituées dans des membranes de liposomes, peuvent lier la BoNT/B. De manière intéressante, cette liaison sur la SYT n'a été observée qu'en présence de GT1b ou GD1a ou d'un mélange de gangliosides en contenant. En mesurant les affinités de la BoNT/B pour les

deux isoformes recombinantes de SYT, ils déterminèrent que la SYT1 et la SYT2 correspondent respectivement aux sites de faible (2,3nM) et haute (0,23nM) affinité, mesurés antérieurement sur des synaptosomes (Nishiki et al., 1996a). Ces résultats obtenus avec des récepteurs de rat insérés dans des membranes montrent d'une part que la SYT2 est un récepteur de meilleure affinité que la SYT1 pour la BoNT/B, et d'autre part, que cette liaison est strictement dépendante de la présence de gangliosides. Par ailleurs, la seule présence de gangliosides au sein des membranes de liposomes ne suffit pas pour provoquer une liaison de la BoNT/B, ce qui suggère fortement que les deux éléments sont interdépendants et coopèrent pour assurer la liaison de la toxine (Nishiki et al., 1996a). Après avoir clairement identifié la SYT comme l'élément protéique indispensable à la liaison de la BoNT/B, T. Nishiki et ses collaborateurs ont déterminé que le site récepteur de la BoNT/B est localisé sur la partie N-terminale de la protéine. Ce domaine se retrouve exposé au milieu extracellulaire lors de la fusion des VSs à la membrane plasmique (Nishiki et al., 1994; Kozaki et al., 1998a).

Le groupe de Chapman a ensuite démontré formellement par des expériences de perte ou de gain de fonction avec des approches cellulaires et *in vivo* que la SYT2 était un récepteur de la BoNT/B. Ces auteurs ont délimité le domaine d'interaction de la BoNT/B aux 20 résidus juxtamembranaires du domaine N-terminal de la SYT, soit le domaine 32-52 pour la SYT1 de rat et 40-60 pour la SYT2 de souris (Dong et al., 2003). Par ailleurs, il a été observé que les 10 résidus juxtamembranaires de SYT1 et SYT2 sont cruciaux pour la liaison de la BoNT/B (Rummel et al., 2003).

Dans des expériences de co-précipitation, la SYT2 recombinante ou un peptide N-terminal de la SYT2 mais pas de la SYT1 peuvent lier la BoNT/B en absence de ganglioside (Dong et al., 2003; Frisk et al., 2011). Cependant dans un contexte cellulaire, il a été montré que la BoNT/B ne pouvait pas lier la SYT2 transfectée dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) en absence de GT1b (Nishiki et al., 1996b). Ces résultats suggèrent que l'accessibilité de la BoNT/B pour la SYT2 dans un contexte membranaire n'est pas identique à celle réalisée en solution. De manière intéressante, l'entrée de la BoNT/B dans des cellules PC12 exprimant la SYT1 nécessite l'ajout de gangliosides exogènes alors que dans des cellules PC12 déficientes pour SYT1 (ou PC12 Δ SYT1) mais exprimant de manière stable la SYT2, cette entrée peut être observée sans ajout de gangliosides (Dong et al., 2003). Bien que les auteurs semblent conclure que la SYT2 seule serait suffisante pour internaliser la BoNT/B, la

présence probable de gangliosides endogènes dans ces cellules neuroendocrines, qui n'a pas été évaluée dans ces expériences, est alors susceptible de favoriser la liaison. Néanmoins, ces résultats suggèrent que la liaison de la BoNT/B sur la SYT2 est quantitativement moins dépendante des gangliosides que celle sur la SYT1 dans ce contexte membranaire.

Enfin, il a été proposé que la SYT2 humaine ne serait pas un récepteur effectif pour la BoNT/B. En effet, des données montrent que le fragment N-terminal/transmembranaire (1-87) de la SYT2 de souris, n'est plus capable de lier la BoNT/B par co-précipitation dès lors qu'elle est mutée (F54L) pour mimer la séquence humaine. De plus, comparé à la SYT2 sauvage de souris, cette mutation réduit également la liaison de la BoNT/B sur des neurones KO SYT1 (Peng et al., 2012). Cela étant, il a été observé chez la souris que la SYT2 est l'isoforme majoritairement exprimée au niveau des JNMs (une sous population représentant environ 40% des neurones co-expriment la SYT1 et la SYT2) alors que la SYT1 est davantage présente dans les neurones centraux (Perin et al., 1990; Pang et al., 2006a). Les résultats de Peng et collaborateurs suggèrent que la BoNT/B (et les sérotypes BoNT/G et BoNT/D-C) ciblent par conséquent la SYT1 chez l'homme (Peng et al., 2012).

iv. Etude structurale de l'interaction SYT2-BoNT/B

Deux études cristallographiques réalisées en 2006 ont permis de caractériser l'interaction entre le domaine HC/B (Jin et al., 2006) ou la BoNT/B (Chai et al., 2006) et le domaine N-terminal de la SYT2.

Lors de l'interaction avec la BoNT/B, le domaine 44-60 de la SYT2 adopte une structure secondaire en hélice α (de la Phe₄₇ à l'Ile₄₈) et s'enfouit dans une crevasse localisée dans la partie distale de HC/B (**Figure 22**). Ce sillon moléculaire en forme de selle comprend deux poches plus profondes qui abritent des résidus hydrophobes interagissant avec des acides aminés de la BoNT/B ce qui indique une prépondérance de liaisons hydrophobes dans l'interaction entre HC/B et la SYT2 (Chai et al., 2006).

Pour la SYT2 de rat, les mutations sur les résidus Phe₄₇, Phe₅₄, Phe₅₅, Glu₅₇ provoquent une perte totale de liaison par co-précipitation, ce qui montre leur importance cruciale dans la liaison avec la BoNT/B. Sur cette dernière, les mutations des résidus Val₁₁₁₈, Lys₁₁₉₂, Phe₁₁₉₄, Ala₁₁₉₆ et Phe₁₂₀₄ abolissent également sa liaison par co-précipitation et réduisent significativement

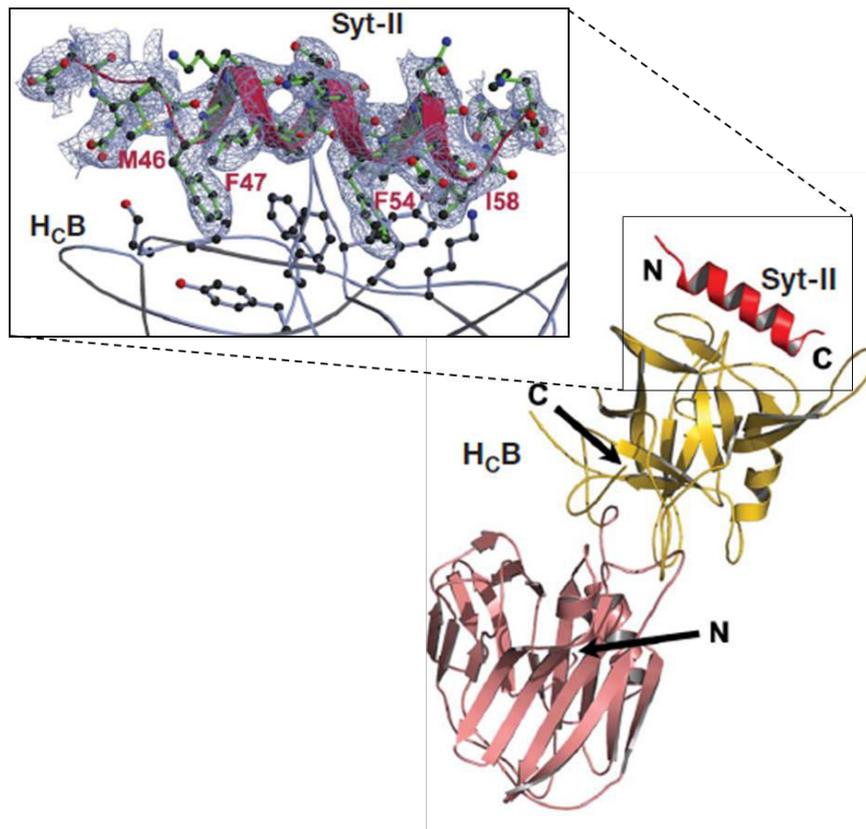


Figure 22 : Structure cristalline de l'interface d'interaction du complexe Hcc/B-SYT2. L'interface d'interaction entre le domaine Hcc/B (858-1291) et la SYT2 (8-61) de rat est examinée avec une résolution de 2.15 Å. La liaison de la HcB mobilise plusieurs résidus du domaine N-terminal (46-58) de la SYT2 et induit l'adoption d'une structure en hélice α entre les résidus 47 et 58 de la SYT2 (d'après Jin et al. 2006).

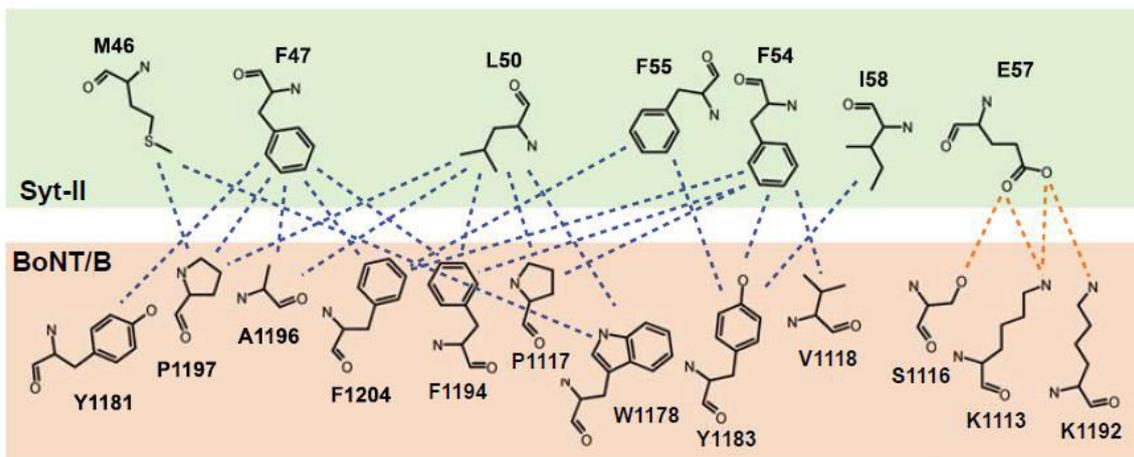


Figure 23 : Représentation schématique de l'interface entre BoNT/B et la SYT2. Les liaisons hydrophobes et les ponts salins entre les résidus de la SYT2 (zone verte) et ceux de la BoNT/B (zone orangée) sont respectivement représentés par des lignes pointillées bleues et oranges (d'après Jin et al. 2006 supplemental).

sa toxicité (Jin et al., 2006). Ces expériences ont aussi révélé l'implication d'autres résidus de la SYT2 (Leu₅₀, Ile₅₈ et Met₄₆ de manière moins significative) et de la BoNT/B, (Tyr₁₁₈₁, Pro₁₁₉₇, Pro₁₁₁₇, Trp₁₁₇₈, Tyr₁₁₈₃) dans l'interaction entre les deux partenaires (Jin et al., 2006) (**Figure 23**).

L'étude de Chai a confirmé que parmi les résidus Phe₄₇, Leu₅₀, Phe₅₄, Phe₅₅ et Ile₅₈ de la SYT2 s'enfonçant dans la crevasse de la BoNT/B, les trois phénylalanines (Phe₄₇, Phe₅₄, Phe₅₅) sont critiques pour la liaison (Chai et al., 2006). En dehors de la crevasse, les résidus Lys₅₁, Lys₅₃ et Glu₅₇ interviendraient également pour soutenir l'interaction (Chai et al., 2006) contrairement aux résultats de R. Jin qui suggèrent l'absence d'implication de ces résidus lysine dans l'interaction.

En outre, ce dernier a proposé que les lysines du domaine juxta membranaire de la SYT2, localisées sur la face hydrophile de l'hélice α , interagissent avec des lipides chargés négativement de la membrane plasmique. La charge globale négative de la BoNT/B induirait une orientation perpendiculaire du domaine H_{CN} par rapport au plan de la membrane alors que la partie juxtamembranaire de la SYT2 serait couchée de façon tangentielle à la membrane plasmique (**Figure 24**). Une boucle hydrophobe de la BoNT/B localisée entre les deux sites de fixation pour la SYT et le GT1b pourrait aussi interagir avec la membrane et favoriser l'interaction.

En comparant les séquences de la SYT1 et la SYT2 de rat, il apparaît que six résidus diffèrent parmi la quinzaine de résidus juxtamembranaires (domaine 46-60 pour la SYT2/ 38-52 pour la SYT1) (**Figure 25**). Il a été montré que les mutations « SYT1-like » opérées sur la partie juxtamembranaire du domaine N-terminal de la SYT2 ne produisent pas de changements notables dans la liaison des mutants SYT2 sur la BoNT/B par co-précipitation hors mis les deux mutations Ile₅₈Leu et Asn₅₉His responsable de l'apparition d'une ganglioside-dépendance semblable à celle de la SYT1 (Chai et al., 2006). Réciproquement, les mutations inverses (Leu₅₀Ile et His₅₁Asn) dans la SYT1 octroient aux deux mutants des capacités de liaison de la BoNT/B en absence de gangliosides (Chai et al., 2006). Ces résultats indiquent qu'une certaine indépendance vis-à-vis des gangliosides, propre à la SYT2 pour la liaison de la BoNT/B, est supportée par les résidus Ile₅₈ et Asn₅₉ chez le rat.

Une troisième étude structurale incluant la partie H_C/B, la SYT2 et un analogue du GD1a (Berntsson et al., 2013) a confirmé les résultats des deux précédentes études et a

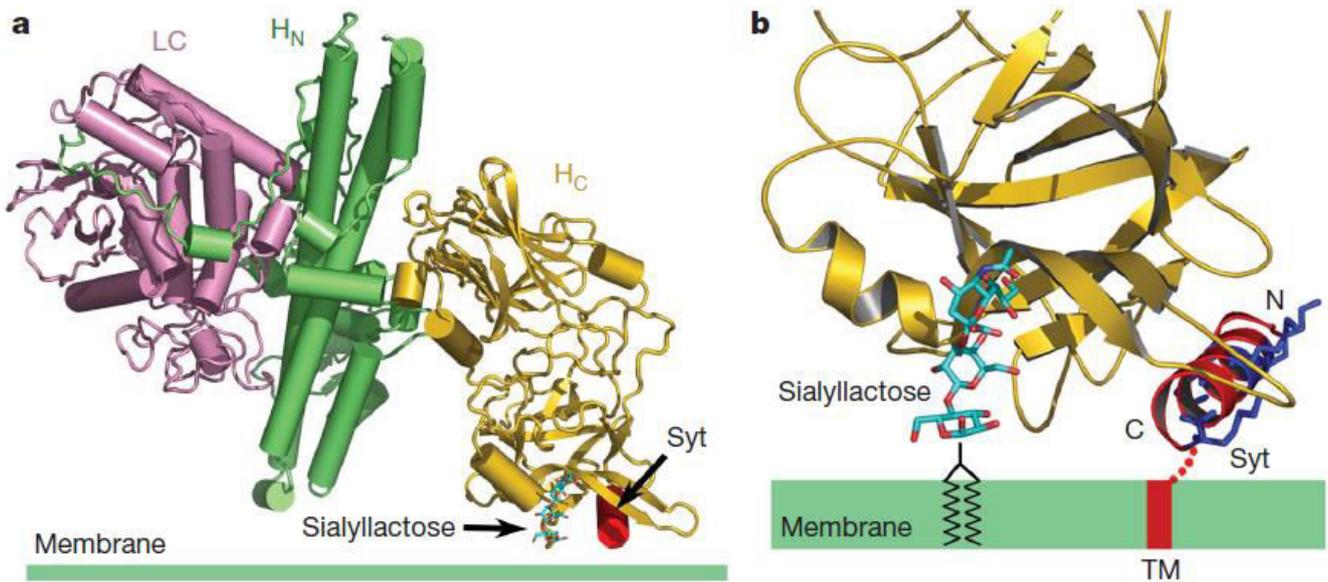


Figure 24 : Modélisation de la double liaison de la BoNT/B sur le sialyllactose et la SYT2 insérés dans des membranes. La structure du sialyllactose lié à la BoNT/B (PDB 1F131) a été superposée au complexe HcB-SYT2 selon les coordonnées du fragment HcB pour réaliser l'alignement. a) La chaîne légère (LC), la partie N-terminale de la chaîne lourde (H_N) et son domaine C-terminal (H_C) sont représentés en rose, vert et doré respectivement. b) Une vue rapprochée de l'interface proposée entre la BoNT/B et les deux récepteurs membranaires. Quatre résidus lysine conservés entre la SYT1 et la SYT2 sont colorés en bleus. La distance entre les deux sites d'interaction existant pour le ganglioside (ici représenté par un analogue glycolipidique) et la SYT a été estimée à 15 Å (d'après Jin et al. 2006).

▼▼

Syt-II 40 . . . **GESQEDMFAKLKDKFFNEINKI** . . .
Syt-I 32 . . . **GEGKEDAFSKLKQKFMNELHKI** . . .

Figure 25 : Alignement de séquences entre les domaines N-terminaux de la SYT1(40-60) et de la SYT2(38-52) de rat. Les résidus conservés sont affichés en rouge. La ligne verte représente la zone d'interaction entre les résidus de SYT1 ou SYT2 et la BoNT/B. Enfin, les triangles bleus pointent les deux résidus impliqués dans la dépendance(SYT1)/indépendance (SYT2) aux gangliosides pour la liaison de BoNT/B (d'après Jin et al. 2006).

conforté l'idée que la BoNT/B ne change pas de conformation lorsqu'elle est liée au ganglioside et à la SYT2.

L'ensemble de ces études montrent que la SYT2 et le ganglioside occupent des sites de liaisons adjacents mais bien distincts au sein de la chaîne lourde de la BoNT/B, séparés par une distance minimale de 15 Å (Chai et al., 2006; Jin et al., 2006; Berntsson et al., 2013) (**Figure 24**).

b. Protéines SV2

i. *Structure et propriétés*

SV2 est une protéine transmembranaire très conservée retrouvée dans les VSs et les VLCDs des vertébrés (Südhof, 2004). Trois isoformes ont été décrits, soit les protéines SV2A, SV2B et SV2C, avec une expression différentielle au sein du système nerveux central. L'isoforme le plus abondant, SV2A, est largement distribué parmi les différentes aires cérébrales alors que SV2B et surtout SV2C ont une expression plus restreinte (Bajjalieh et al., 1994; Janz and Südhof, 1999; Löscher et al., 2016). Moins largement distribuée, SV2B est tout de même co-exprimée aux côtés de SV2A dans de nombreuses régions telles que le cortex cérébral ou l'hippocampe (Bajjalieh et al., 1993). SV2B représente l'isoforme majoritaire dans certains neurones comme les cellules bipolaires de la rétine (Wan et al., 2010). A l'inverse, SV2A est le seul isoforme représenté dans de nombreux neurones inhibiteurs GABAergiques (Bajjalieh et al., 1994; Gronborg et al., 2010). Quant à la SV2C, elle est bien plus minoritaire et principalement exprimée dans les régions phylogénétiques ancestrales du cerveau comme le tronc cérébral, le mésencéphale ou les bulbes olfactifs (Janz and Südhof, 1999).

SV2 présente une forte homologie avec des transporteurs de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily) tel que le transporteur de glucose humain (Feany et al., 1992; Mendoza-Torreblanca et al., 2013). L'analyse de la séquence primaire de cette protéine prédit une douzaine de segments transmembranaires : Les extrémités N- et C-terminale de SV2 étant cytosoliques, six segments extramembranaires connectant les hélices transmembranaires sont exposés dans la lumière vésiculaire (Mendoza-Torreblanca et al., 2013). Parmi ces segments luminaux on trouve quatre boucles relativement courtes (L1, L2, L3) ainsi qu'une longue boucle (L4) portant trois sites putatifs de N-glycosylation (**figure 26**).

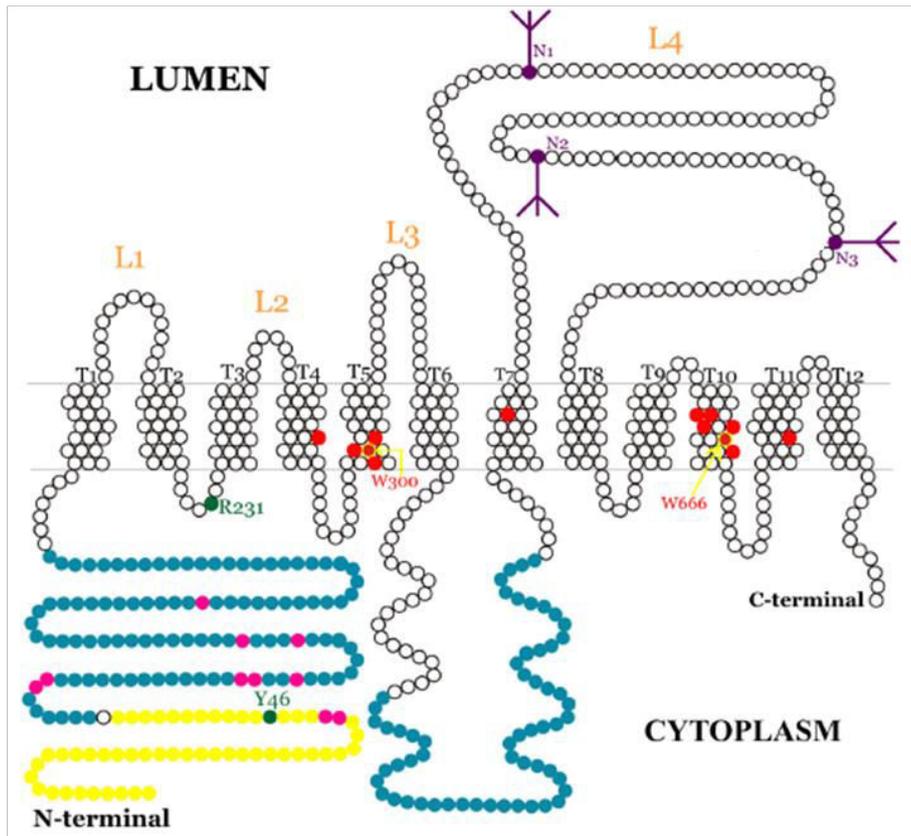


Figure 26 : Représentation schématique de la topologie de SV2A. La protéine comprend 12 segments transmembranaire (T1 à T12), 4 boucles luminales/extracellulaires (L1, L2, L3, L4), 5 boucles cytosoliques ainsi que des domaines C- et N-terminaux orientés dans le cytosol. Une portion du domaine N-terminal (jaune) constitué par les 57 premiers résidus correspond au site d'interaction avec la SYT1. Le résidu Tyr46 représenté en vert dans le domaine N-terminal est nécessaire pour l'adressage de SV2A vers les VSs. Une dizaine de sites putatifs de phosphorylation (points roses) sont représentés au sein du domaine N-terminal cytosolique et les nombreux sites putatifs de liaison à l'ATP sont représentés en bleu sur le domaine N-terminal et la boucle cytosolique reliant les segments T6 et T7. Les trois sites putatifs de glycosylations sont représentés sur la boucle L4 par des branches violettes et les 14 résidus impliqués dans la liaison du levetiracetam sont représentés en rouge. L'agencement des résidus est ici déterminé selon les régions prédites par UniProt (SV2A-Q02563) (d'après Mendoza-Torreblanca et al. 2013).

C'est d'ailleurs notamment en raison de cette glycosylation importante que le poids moléculaire de la forme native de SV2A dépasse significativement le poids moléculaire théorique de 83kDa (Janz et al., 1999). De plus, deux sites de liaison à l'ATP et dix sites putatifs de phosphorylation sont également prédits (Mendoza-Torreblanca et al., 2013).

Dans les VSs, les protéines SV2 peuvent interagir avec différents partenaires. Ainsi, une liaison avec le domaine cytoplasmique de la SYT1 a été mise en évidence pour les trois isoformes de SV2 avec un effet inhibiteur du Ca^{2+} (Schivell et al., 2005). Le domaine N-terminal de SV2A et SV2C abritent tous deux, un site de liaison pour la SYT1 qui les rend moins sensibles que la SV2B à l'effet inhibiteur du Ca^{2+} sur la liaison SV2-SYT1.

ii. Fonction des protéines SV2

SV2A est l'isoforme la plus étudiée. Bien que de nombreux éléments indiquent que la SV2A est impliquée dans la modulation de l'excitabilité neuronale au sein du SNC, son rôle exact dans la neurotransmission demeure non élucidé (Löscher et al., 2016; Mendoza-Torreblanca et al., 2013).

Tout d'abord, en raison de son homologie avec certains transporteurs, de sa topologie membranaire et de sa localisation dans les VSs, la SV2A a été logiquement suspectée de remplir la fonction de transporteur vésiculaire (Mendoza-Torreblanca et al., 2013). Cette hypothèse a néanmoins été écartée en raison de l'expression de la protéine dans des synapses libérant différents types de neurotransmetteurs, de sa faible homologie avec les transporteurs de neurotransmetteurs mais aussi du fait que l'absence de SV2 n'impacte pas la quantité de glutamate chargée dans les VSs (Bajjalieh et al., 1992, 1994; Custer et al., 2006). Il a aussi été proposé que SV2A joue un rôle dans le transport des ions Ca^{2+} ou chlorure (Cl^-). La présence de deux résidus chargés négativement au sein du premier segment transmembranaire de la protéine a conduit à l'hypothèse d'un transporteur calcique (Janz and Südhof, 1999). Cependant, dans des cellules INS-1 (cellules endocrines de rat dérivées du pancréas) transfectées avec l'aequorine (protéine luminescente capable de produire de la lumière en présence de Ca^{2+}), il a été montré que la modulation d'expression de SV2A n'impacte pas la concentration cytosolique ou vésiculaire de Ca^{2+} (Iezzi, 2005). Aussi, l'hypothèse d'un transport de Cl^- par SV2A a été proposée sur la base d'une cohérence entre l'omniprésence de ces ions dans les VSs et la distribution quasi-ubiquitaire

de SV2A dans les neurones centraux (Bajjalieh et al., 1994). Pour autant, le fait que le transport de Cl⁻ dans les VSs des neurones glutamatergiques soit essentiellement assuré par le transporteur vésiculaire du glutamate (VGlut-1) nuance fortement cette dernière hypothèse (Schenck et al., 2009).

Concernant l'interaction entre SV2A et la SYT, il a été décrit qu'un résidu tyrosine (Tyr₄₆) du motif d'endocytose de SV2A est crucial pour le double adressage de SV2A et SYT dans les VSs. De plus, dans les neurones n'exprimant aucune isoforme de SV2, la diminution d'expression de la SYT peut être récupérée par l'expression exogène d'une SV2A mutée (Tyr₄₆Ala) aussi bien qu'avec la SV2 sauvage. Par conséquent, la SV2A impacte d'une part l'expression de la SYT et d'autre part son adressage, par deux mécanismes distincts (Yao et al., 2010).

Les souris KO pour SV2A ne présentent aucune anomalie à la naissance mais développent par la suite un phénotype évoquant de multiples déficits neuronaux, avec une croissance altérée s'accompagnant de sévères convulsions et d'une mort prématurée survenant à trois semaines (Crowder et al., 1999). De manière intéressante, cette étude décrit aussi que la perte de SV2A induit une diminution de la neurotransmission GABAergique évoquée dans la région CA3 de l'hippocampe. De plus, l'altération de la neurotransmission chez ces animaux déficients pour SV2A n'est pas liée à des variations morphologiques ou du nombre des VSs ou des synapses, ce qui montre que SV2A n'est pas indispensable pour l'intégrité structurale neuronale ou la biogénèse des VSs (Crowder et al., 1999). En revanche, ces résultats suggèrent plutôt que SV2A est essentielle pour la régulation de la libération évoquée (Crowder et al., 1999; Janz et al., 1999; Mendoza-Torreblanca et al., 2013). L'étude électrophysiologique des neurones hippocampiques provenant d'animaux KO pour SV2A et/ou SV2B a confirmé que ces deux isoformes pouvaient réguler l'exocytose des VSs. En effet, bien que les cellules déficientes pour SV2A ou SV2B ne manifestent aucune anomalie (à l'exception de la diminution de la transmission GABAergique observée dans des tranches d'hippocampe déficientes pour SV2A), les neurones privés des deux isoformes de SV2 présentent une augmentation persistante de la transmission synaptique lorsque plusieurs PA sont déclenchés successivement. Aussi, cette augmentation de transmission peut être partiellement inhibée par l'ajout d'EGTA (chélateur calcique), ce qui met en lumière l'implication du Ca²⁺ dans la fonction de SV2 (Janz et al., 1999).

Bien que son lien exact avec le Ca^{2+} ne soit pas complètement établi, SV2A apparaît comme un modulateur de l'exocytose : sa surexpression et sa suppression sont respectivement corrélées à une diminution ou augmentation du niveau de calcium intracellulaire d'une part et de la libération de neurotransmetteurs d'autre part.

De manière notable, la SV2A est le récepteur du levetiracetam, une drogue aux effets anti-épileptiques (Löscher et al., 2016). Il a été décrit qu'une exposition prolongée au LEV réduisait le niveau d'exocytose dans des tranches d'hippocampe (Yang et al., 2007). Et bien que le mécanisme d'action du levetiracetam sur la SV2A ne soit pas pleinement élucidé, il a été proposé que ce composé stabilise de manière allostérique une conformation de SV2A favorisant son action anti-convulsante (Daniels et al., 2013).

Au-delà de leur distribution restreinte au niveau du SNC, les fonctions physiologiques respectives de SV2B et de SV2C sont encore très peu connues et contrairement aux animaux KO pour SV2A, l'inactivation génique de SV2B ou de SV2C, ne manifeste aucun phénotype (Löscher et al., 2016; Mendoza-Torreblanca et al., 2013). Certaines données comme l'absence d'anomalies électrophysiologiques des cellules simplement KO pour SV2A, suggèrent une certaine redondance fonctionnelle entre SV2A et SV2B responsable de la compensation (Janz et al., 1999). Aussi, dans des synapses rétiniennes, la suppression du seul isoforme SV2B induit une diminution de l'expression de la SYT1 (Lazzell et al., 2004). Ces données suggèrent qu'en absence de SV2A, l'expression de la SYT1 est régulée par la SV2B. D'autres données indiquent que la fonction de SV2B peut se révéler dans un contexte pathologique. En effet, les souris KO pour SV2B ne subissent pas les déficits cognitifs induits par l'injection de peptides amyloïdes β_{25-35} chez les animaux sauvages (Detrait et al., 2014). A la différence de SV2B, SV2C partage avec SV2A un site de liaison à la SYT au niveau du domaine N-terminal, ce qui suggère un mode de coopération avec la SYT semblable entre les deux isoformes (Schivell et al., 2005). Par ailleurs, la surexpression de SV2C observée dans certains modèles d'épilepsie ou de maladie de Parkinson suggère que cette isoforme serait impliqué dans un processus de remodelage présynaptique consécutif à une hyperexcitabilité neuronale ou autres conditions de stress cellulaire (Löscher et al., 2016).

iii. SV2 : récepteur de la BoNT/A et de la BoNT/E

La BoNT/A peut lier les trois isoformes de la protéine SV2 (SV2A-C), avec une meilleure affinité pour la SV2C (Dong, 2006). En revanche, la BoNT/E lie uniquement la SV2A et la SV2B, avec une liaison préférentielle sur SV2A (Dong et al., 2008; Mahrhold et al., 2006). De façon similaire à la liaison de la BoNT/B sur la SYT1, la liaison de BoNT/E sur les neurones nécessite la présence de gangliosides (Dong et al., 2008). D'ailleurs, la mutation Trp₁₁₂₄Leu, localisée dans la poche de liaison au gangliosides de HC/E, provoque une diminution significative de sa liaison sur le domaine luminal de SV2A par co-précipitation (Mahrhold et al., 2013). D'autres expériences indiquent que les gangliosides polysialilés sont essentiels pour l'activité de la BoNT/A dans des cellules N2a (lignée cellulaire murine issue de neuroblastome) (Yowler, 2002). De manière contrastée, certaines données suggèrent que la liaison de BoNT/A ne serait pas strictement dépendante de la présence de gangliosides. Par exemple, la liaison de HC/A sur une protéine de fusion GST-SV2C (454-603) a été décrite en absence de gangliosides (Mahrhold et al., 2006).

Le principal domaine luminal de SV2 formé par la boucle L4 correspond au domaine de liaison pour la BoNT/A ou la BoNT/E (Dong, 2006; Dong et al., 2008). De manière intéressante, la glycosylation de ce domaine est essentielle pour la liaison de la BoNT/E mais moins déterminante pour celle de la BoNT/A (Dong, 2006; Dong et al., 2008). En effet, dans des neurones d'hippocampe de souris KO SV2, il a été décrit que l'expression d'une SV2 portant une mutation dans le troisième site putatif de N-glycosylation dans la boucle L4 (Asn₅₇₃Gln), provoque une perte de liaison totale de la BoNT/E mais une perte de liaison partielle pour la BoNT/A. En revanche, les mutations Asn₄₉₈Gln et Asn₅₄₈Gln ciblant respectivement le premier et second site de N-glycosylation présents sur la boucle L4 n'influencent pas l'interaction avec les BoNTs (Dong et al., 2008).

Récemment, l'affinité de la HC/A pour le domaine soluble 455-579 de la SV2C humaine correspondant à la boucle L4 a été mesurée par SPR (Mahrhold et al., 2016). En absence de gangliosides, les auteurs ont ainsi déterminé une valeur de K_D de l'ordre de 1.10^{-7} M avec un fragment glycosylé de SV2C. Dans le même type d'expérience la mutation Asn₅₅₉Ala du fragment de SV2C provoque une perte d'affinité significative avec un K_D de l'ordre de 1.10^{-6} M. De manière cohérente avec les résultats de M. Dong précédemment décrits, ces résultats confirment l'importance du troisième site de glycosylation pour le récepteur

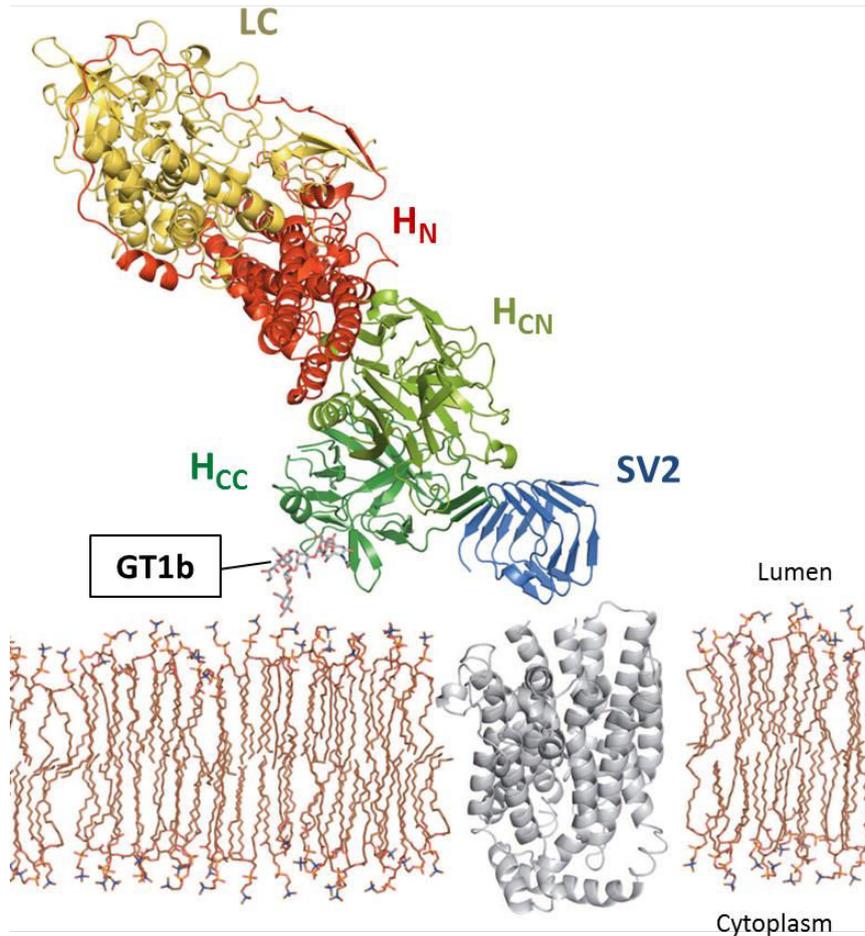


Figure 27 : Modèle de liaison simultanée de la BoNT/A sur la SV2C et le GT1b. La ganglioside (GT1b) et le domaine luminal de la SV2C (SV2) se lient à deux versants opposés de la partie C-terminale du domaine de liaison de la BoNT/A (H_{CC}). La partie N-terminal du domaine de liaison (H_{CN}), le domaine de translocation (H_N) ainsi que la chaîne légère (LC) sont orientés à l'opposé des sites de liaison. Le domaine transmembranaire de SV2C est représenté en gris et la position relative de la membrane plasmique est proposée en marron (d'après Benoit et al. 2013).

humain. Néanmoins, l'affinité mesurée avec une protéine glycosylée reste bien en deçà des K_D physiologiques et souligne ainsi la présence potentielle d'autres déterminants, probablement structuraux, dans la séquence entière de SV2 et impliqués dans son interaction avec les BoNTs.

iv. Etude structurale des complexes SV2-BoNT/A, E

Plusieurs études structurales ont permis d'identifier une surface d'interaction relativement étendue entre la SV2 et les BoNT/A et E. Ainsi, il a été décrit que le domaine luminal L4 de SV2 forme une hélice β qui interagit avec la BoNT/A au niveau d'un domaine quasiment opposé et distant d'environ 40 Å du site d'interaction avec les gangliosides (Benoit et al., 2013; Weisemann et al., 2016) (**Figure 27**). Au niveau de l'interface entre la HcA et la SV2C (529-566), une quinzaine de résidus de SV2C et 19 résidus de BoNT/A composent ce qui représente une aire de contact d'environ 600 Å² (Benoit et al., 2013). Plusieurs de ces résidus sont engagés dans des liaisons hydrogène liant des brins β des deux partenaires (**Figure 28**). De manière intéressante, la liaison de la BoNT/A ou de la BoNT/E sur la SV2 fait intervenir la partie H_{CN} de la toxine. Ainsi, il a été montré que la partie H_{CC}/E seule ne lie pas aussi efficacement le domaine luminal de la SV2C glycosylé en comparaison de la partie HcE complète (Mahrhold et al., 2013). De plus, un anticorps dont l'épitope chevauche les parties H_{CC} et H_{CN} de BoNT/A est capable de bloquer la reconnaissance de la SV2C par la BoNT/A ou la Hc/A (Strotmeier et al., 2014). Par conséquent, la conformation tri-dimensionnelle du domaine luminal de SV2 semble être importante pour la liaison de BoNT/A ou de la BoNT/E. Toutefois, contrairement à l'effet conformationnel observé pour la liaison de la BoNT/B sur la SYT, la structure en alpha-hélice du domaine luminal L4 de SV2 existe indépendamment et n'est pas induite par la liaison de la BoNT/A ou de la BoNT/E (Weisemann et al., 2016). Enfin, la liaison de la BoNT/A ou de la BoNT/E sur la SV2 est sensible au pH (Weisemann et al., 2016). De manière intéressante et en contraste de la liaison BoNT/B sur la SYT, une diminution de pH de 7,5 à 5 qui mime l'acidification des VSs lors de leur recyclage, diminue d'un facteur 5 la liaison de BoNT/A sur le domaine de liaison de SV2A (Benoit et al., 2013).

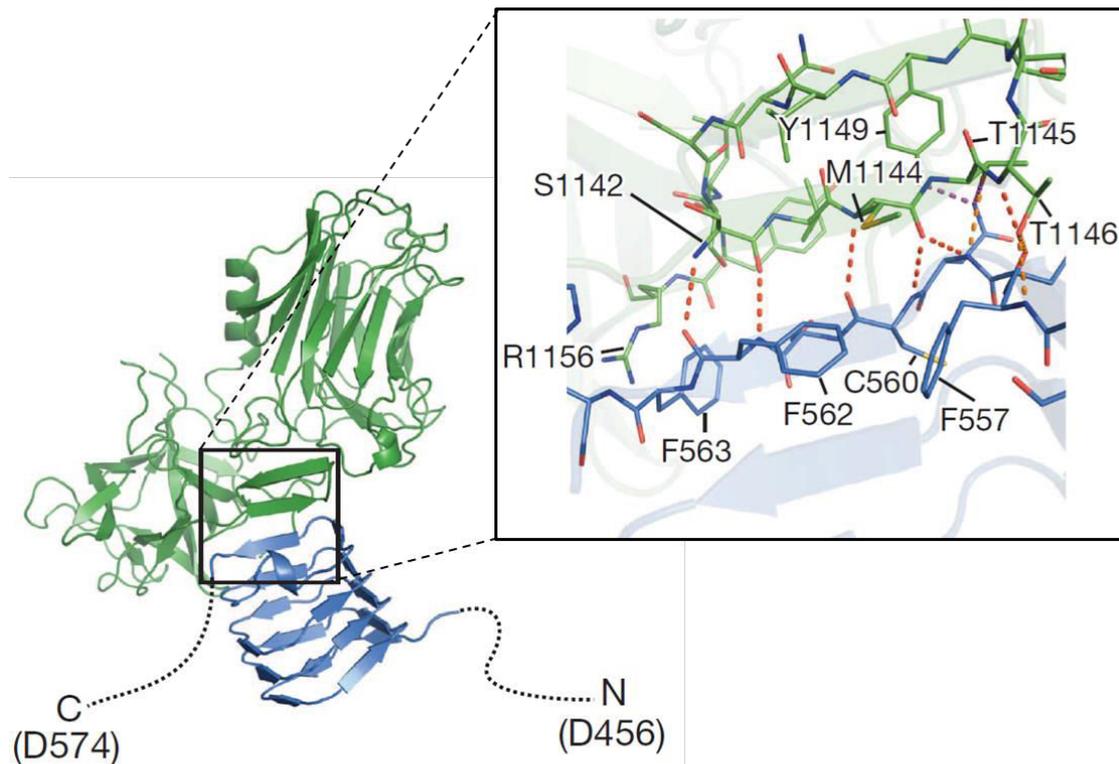


Figure 28 : Le complexe H_α/A-SV2C(L4). (A gauche) Représentation de l'interaction entre la chaîne lourde de la BoNT/A (H_α/A, en vert) et la boucle L4 de la SV2C (en bleu). Les lignes en pointillés représentent les régions flexibles de la boucle L4 de SV2C. Les résidus aux extrémités de la construction de SV2C utilisée sont également indiqués. Encadré : Vue rapprochée du site d'interaction où les liaisons hydrogène sont représentés par des lignes de pointillés en orange. Les interactions entre les chaînes latérales des résidus sont représentées par des lignes de pointillés en violet (d'après Benoit et al. 2013).

3. Différents modèles de liaison sur le double récepteur

La co-existence de deux types de récepteurs à la surface des neurones introduit un certain degré de complexité dans la dissection du mode de liaison des BoNTs. Ce type d'interaction à trois partenaires soulève notamment plusieurs interrogations concernant d'une part le(les) rôle(s) respectif(s) de chacun des partenaires et d'autre part leur séquence d'interaction gouvernant la première étape de l'intoxication neuronale. De manière intuitive et sans considérer aucune notion de hiérarchie entre les gangliosides et les récepteurs protéiques, l'intervention de ces deux co-récepteurs fait que deux types de modèles alternatifs peuvent être considérés (Schiavo, 2004): un modèle de liaison séquentiel qui sous-tend la liaison de la toxine à un premier récepteur pour permettre dans un second temps la liaison au second récepteur, ou un modèle de liaison simultanée où la toxine se lierait en même temps sur son double récepteur (**Figure 29**).

a. Modèle de liaison séquentielle

Le concept du double récepteur a été proposé il y a plus de 30 ans par C. Montecucco, soit bien avant l'identification du premier récepteur protéique des BoNTs (Montecucco, 1986). Ainsi, afin de réconcilier les éléments recensés à l'époque concernant la liaison des BoNTs et de la TeNT, cet auteur introduit l'hypothèse, alors nouvelle, de l'intervention d'un récepteur protéique à la base d'un modèle de liaison unique pour la TeNT et les BoNTs. Dans ce modèle, la BoNT (ou la TeNT) se lie premièrement à un ganglioside de la série G1b, puis le complexe intermédiaire formé par la BoNT et le ganglioside se déplace dans le plan de la membrane par diffusion latérale jusqu'à permettre une seconde liaison de la BoNT sur son récepteur protéique qui ne serait exprimé à la membrane que transitoirement, ce qui achève la formation du complexe ternaire final (**Figures 29, 30**). Selon ce modèle, la première liaison est réversible et le ganglioside représente un site de faible affinité. Par contre, la liaison consécutive de ce premier complexe sur le récepteur protéique est beaucoup plus robuste puisque le double récepteur crée un site de très haute affinité. En effet, Montecucco propose que la constante de liaison de la BoNT sur le double récepteur corresponde au produit des constantes de liaison individuelle sur le gangliosides et le

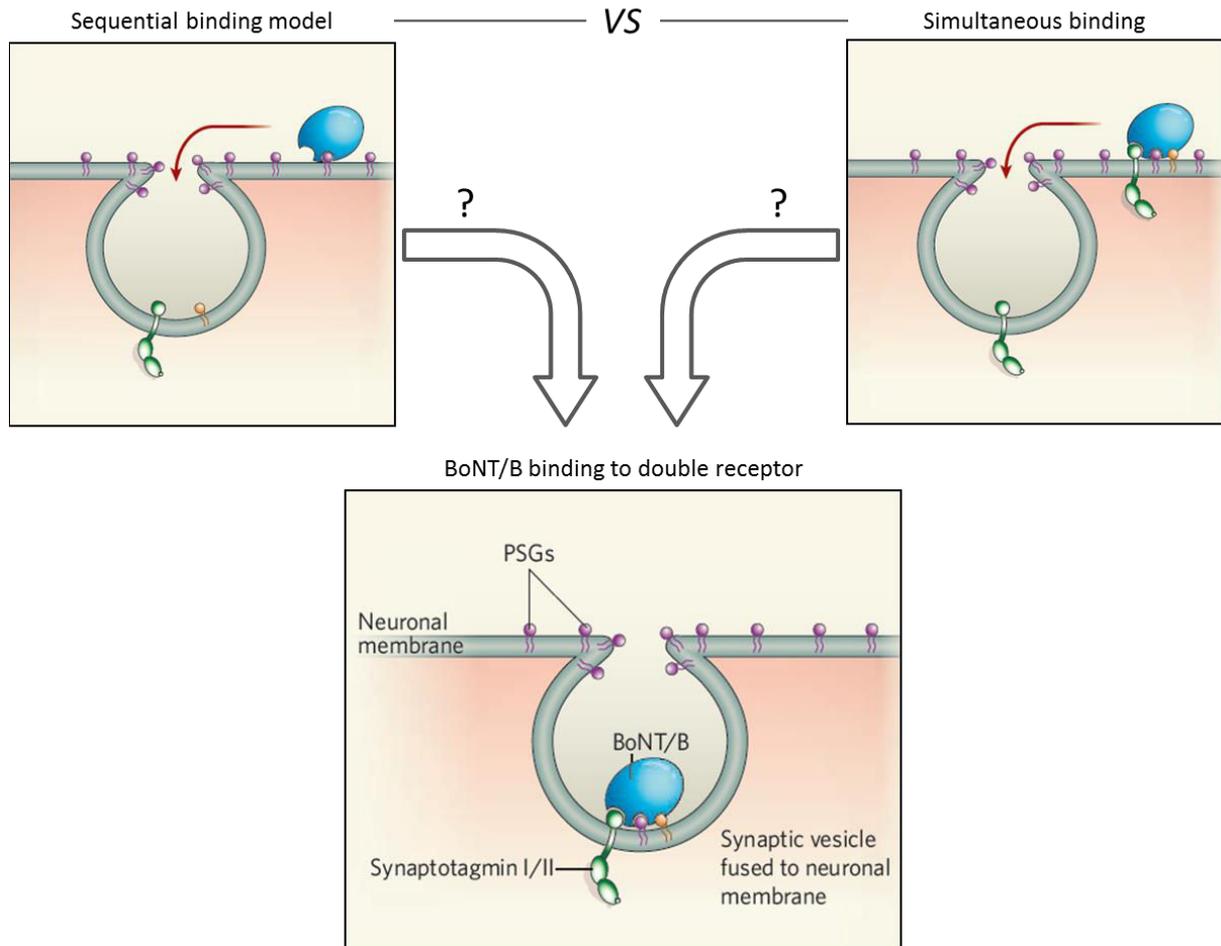


Figure 29 : Deux modes de liaison alternatifs de la BoNT/B sur son double récepteur. La liaison de la BoNT/B sur son double récepteur (en bas), composé de gangliosides polysialylés (PSGs, en violet) et de la synaptotagmine (Synaptotagmin I/II, en vert), peut être la conséquence soit d'une liaison séquentielle (en haut à gauche) soit d'une liaison simultanée (en haut à droite). Dans le premier cas, la BoNT/B se lie au ganglioside pour ensuite se déplacer par diffusion latérale dans le plan de la membrane jusqu'à interagir avec une molécule de SYT exposée lors de l'exocytose des VSs. Dans le second cas, la BoNT/B rencontre directement les deux récepteurs co-localisés au sein de la membrane, pour ensuite gagner une zone d'endocytose. En outre, il n'est pas exclu que d'autres éléments tels que des phospholipides anioniques (en orange) puissent participer à cette liaison (d'après Schiavo et al. 2004).

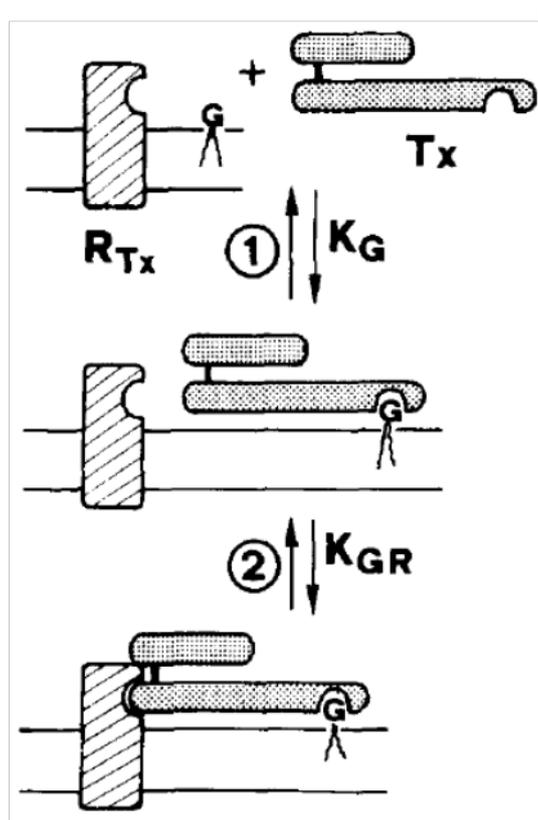


Fig.30 : Modèle du double récepteur selon Montecucco. Les deux étapes consécutives de l'interaction des toxines botuliques et tétanique avec les membranes neuronales sont représentées : la première étape (1) correspond à la liaison de la toxine (Tx) au ganglioside (G) caractérisée par la constante de liaison (K_G); la seconde étape (2) correspond à la liaison de la toxine sur le récepteur protéique (R_{Tx}) après un mouvement latéral de diffusion du complexe ganglioside/toxine dans le plan de la membrane ,et caractérisée par la constante de liaison (K_{GR}). La formation du complexe ternaire ganglioside/toxine/récepteur protéique implique une constante d'association telle que $K_{GR} = K_G \times K_{GR}$ (d'après Montecucco et al. 1986)

récepteur protéique et explique ainsi le gain considérable d'affinité apporté par la double liaison séquentielle par rapport à une simple liaison. Le rôle déterminant des gangliosides, présents en large excès dans la membrane par rapport à la BoNT soluble, serait de concentrer celle-ci dans un volume restreint en réduisant sa liberté de diffusion en solution aux deux dimensions du plan de la membrane. La densité des gangliosides seraient alors susceptible de compenser leur affinité modérée pour les BoNTs, en augmentant la probabilité d'interaction par une augmentation du nombre de sites disponibles (Rossetto et al., 2014). Cet enrichissement de la BoNT dans la membrane favoriserait alors significativement la liaison sur le second partenaire protéique. D'autre part, il a été décrit que les gangliosides, de par leurs charges négatives, auraient un effet électrostatique favorisant le rapprochement du pôle positif du dipôle de la BoNT localisé dans le domaine H_{CC} vers la membrane plasmique (Fogolari et al., 2009).

Avec l'identification des récepteurs protéiques des BoNTs, ce modèle qui a été largement repris dans la littérature est encore considéré aujourd'hui comme le modèle canonique de liaison des BoNTs sur les terminaisons nerveuses (Rossetto et al., 2014; Rummel, 2015). Ce modèle de double récepteur a notamment été renforcé par l'identification de deux sites de liaison distincts, l'un pour le ganglioside et l'autre pour le récepteur protéique, dans la structure de la BoNT/B (Rummel et al., 2007; Berntsson et al., 2013) comme dans celle de la BoNT/A (Strotmeier et al., 2014) ou de la BoNT/E (Mahrhold et al., 2013).

Il faut remarquer cependant que la séquence d'évènements proposée par le modèle de Montecucco ne s'appuie pas sur des observations expérimentales et il existe dans la littérature certains arguments qui vont à l'encontre d'une liaison initiale des BoNTs sur les gangliosides.

Tout d'abord, les gangliosides sont des molécules ubiquitaires qui ne sont pas uniquement exprimées dans les neurones (Simpson, 1989). Ce point est particulièrement difficile à concilier avec la neuro-spécificité notable de la liaison des BoNTs. De plus, dans certaines expériences, le traitement par la neuraminidase des préparations de JNM n'a pas permis de les rendre résistantes à l'action des BoNTs (Simpson, 1989), ce qui suggère fortement que la liaison directe de la toxine sur des gangliosides n'est pas une étape indispensable pour l'intoxication neuronale. D'ailleurs, le constat que les BoNTs peuvent être neutralisés par les gangliosides doit être considéré avec prudence (Simpson, 1989) car

s'il est vrai que certains sérotypes peuvent être effectivement détoxifiés avec de faible concentration de ganglioside, d'autres sont plus résistants (Kitamura et al., 1980; Kozaki et al., 1984). Aussi, le GT1b ne pourrait pas rendre compte de la spécificité de liaison propre aux sérotypes car il n'y a pas de compétition entre la BoNT/A et la BoNT/B pour le binding sur les terminaisons nerveuses de cerveau de rat (Evans et al., 1986). Enfin, il n'y a aucune donnée montrant une liaison importante de BoNT sur des cellules exprimant des gangliosides contrairement par exemple à la toxine cholérique qui lie le GM1. En parallèle il a été mis en évidence que des mutations de la BoNT/B qui affectent la liaison de la toxine au GT1b n'ont pas d'effet sur la liaison au complexe SYT/GT1b ni sur l'affinité pour des neurones en culture (Kohda et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs concluent que la toxicité de la BoNT/B est liée à sa capacité à reconnaître le complexe SYT/GT1b et pas GT1b seul. En revanche, il a été rapporté que toutes les mutations étudiées qui affectent la liaison de la toxine à la SYT ont un effet sur la liaison de la toxine sur des neurones en culture ou sur la toxicité chez l'animal (Rummel et al., 2007).

En somme, l'hypothèse selon laquelle les BoNTs s'accumulent à la surface des membranes neuronales via une liaison d'affinité modérée, avec un KD compris entre 0,2 et 1 μ M, sur des gangliosides polysialilés présents en abondance (Rummel, 2012) n'a pas encore été clairement validée.

b. Modèle de liaison simultanée ?

En parallèle du modèle séquentiel prédominant, un modèle alternatif de liaison simultanée des BoNTs sur leur double récepteur a également été envisagé (Schiavo, 2004; Kammerer and Benoit, 2014). Pour satisfaire à cette exigence, les deux co-récepteurs se doivent alors d'être co-localisés de façon à entretenir une étroite proximité au sein de la membrane plasmique, voire une interaction directe.

En 1998, le groupe de Kozaki a montré que la SYT2 (61-287) peut interagir avec les gangliosides via son domaine transmembranaire (61-87) (Kozaki et al., 1998b). La distance qui sépare les sites de liaison pour les gangliosides et le récepteur protéique, estimée à 15 Å pour la BoNT/B (Berntsson et al., 2013) et 40 Å pour la BoNT/A (Benoit et al., 2013) n'est a priori pas conciliable avec une liaison simultanée sur un double récepteur en complexe. Toutefois, il n'est pas exclu que deux molécules de ganglioside puissent participer en même

temps à la genèse d'un même site de haute affinité en coopération avec le récepteur protéique, la première occupant une poche de liaison à distance de ce dernier mais la seconde pouvant s'associer au récepteur protéique pour éventuellement modifier sa conformation.

III. Protéines membranaires et expression exosomale

1. Expression de protéines membranaires recombinantes

a. Intérêt des protéines membranaires recombinantes

Dans le génome humain, les protéines possédant des segments transmembranaires ou protéines intrinsèques (PMIs) représentent entre 20 et 30% des gènes (Fagerberg et al., 2010; Wallin and von Heijne, 1998). Elles occupent une place prépondérante dans une multitude de fonctions cellulaires, notamment dans les processus de transduction du signal, le transfert et la conversion énergétique, et les voies métaboliques. Du fait de l'omniprésence des PMIs, les mutations et autres anomalies de conformation affectant leur expression ou leur activité sont la cause de nombreuses pathologies (**Figure 31**) (Yildirim et al., 2007). On les retrouve impliquées dans certains cancers, des maladies cardiovasculaires (Bkaily et al., 2014), des maladies neurologiques (Forloni et al., 2002) ou encore métaboliques. Ces protéines font l'objet de nombreuses études structurales et/ou fonctionnelles à visées fondamentales, mais aussi pharmaceutiques comme cibles de molécules actives constituant ainsi plus de la moitié des cibles pour l'ensemble des drogues approuvées par l'agence américaine du médicament. Comme la majorité des PMIs sont exprimées en faible nombre de copies dans les cellules, disposer d'une quantité suffisante de ces protéines pour des études biochimiques représente un défi important. L'extraction et l'enrichissement efficace à partir de sources endogènes ne concerne alors qu'un nombre limité de PMIs exprimées en abondance telles que les ATP synthases (Abrahams et al., 1994). Pour pallier ces difficultés de purification et limiter les risques de contamination par des protéines partenaires endogènes, mais aussi étudier les effets de mutations ponctuelles, les PMIs sont très souvent surexprimés dans des systèmes hétérologues.

Toutefois, bien que la production de protéines recombinantes présente un intérêt certain en biologie, elle demeure un véritable challenge technique, et ce, particulièrement pour les PMIs eucaryotes. Pour cela, plusieurs systèmes d'expression ont été développés.

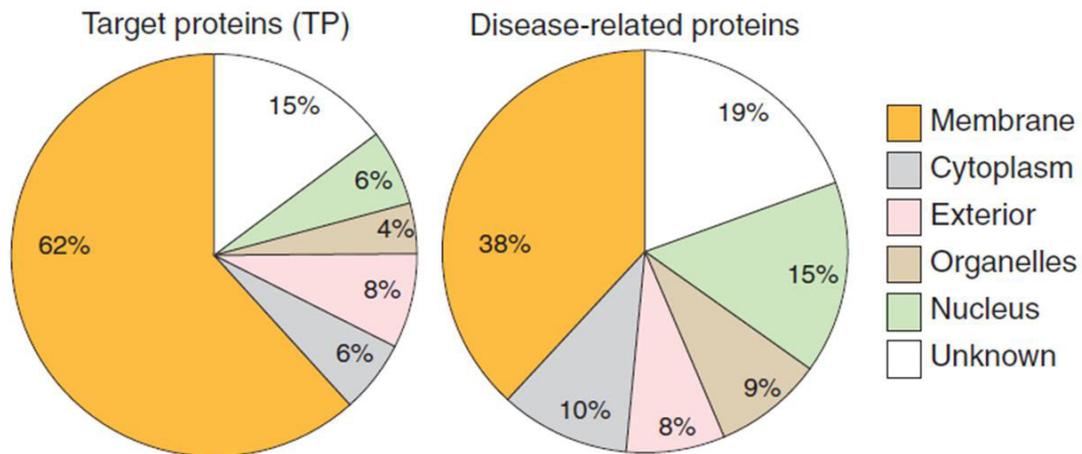


Figure 31 : Représentation des protéines membranaires en tant que cibles thérapeutiques. Les protéines membranaires représentent 62% des cibles des drogues et médicaments (Target proteins ; gauche) et 38% des protéines directement impliquées dans des maladies (Disease –related proteins ; droite) (d’après Yildirim et al. 2007).

b. Les différents systèmes d'expression hétérologues

Le choix d'un système d'expression hétérologue repose, suivant le niveau de complexité de la protéine, sur un compromis entre les aspects qualitatifs, quantitatifs, et autres aspects pratiques de la mise en œuvre. Schématiquement, les cellules les plus évoluées permettront une meilleure expression du point de vue qualitatif, alors que des systèmes plus simples seront supérieurs en termes de rendements. Concernant l'expression de PMIs recombinantes, nous allons considérer quatre principaux systèmes hétérologues, avec pour chacun d'eux, certains avantages et inconvénients.

i. *Bactéries*

Les bactéries, et plus précisément certaines souches d'*Escherichia Coli* (*E. coli*), constituent les systèmes d'expression les plus utilisés pour produire des protéines recombinantes. Et pour cause, le modèle bactérien offre, à moindre coût, de nombreux avantages pratiques tout en conservant une relative simplicité technique. Les cycles de réplication courts ainsi que l'expression rapide des protéines chez la bactérie en font une option peu chronophage avec des rendements de production relativement élevés obtenus avec des méthodes de purification assez simples. Parmi les souches spécialisées, *E. coli* BL21 est très largement employée du fait de sa faible activité protéasique. On peut également citer les souches *E. coli* C41 et *E. coli* C43 qui ont été isolées à partir de contingents d'*E. coli* capables d'exprimer des protéines relativement toxiques, et qui se sont notamment révélées mieux adaptées pour l'expression des PMIs (Miroux and Walker, 1996). Cependant, ce type de système comporte aussi certaines limites relatives à l'organisme hôte.

Premièrement, *E. coli* présente un biais dans l'usage des codons, soit le résultat de l'emploi préférentiel de certains triplets au détriment d'autres codons synonymes. Des stratégies basées sur l'échange de codons synonymes dans les séquences recombinantes, dites « optimisées », ou l'expression dans la cellule hôte d'ARN de transfert reconnaissant des codons rarement utilisés par les bactéries peuvent toutefois corriger les défaillances d'expression (Sahdev et al., 2007).

Deuxièmement, en tant qu'organisme procaryote, *E. coli* ne possède pas l'intégralité des éléments composant la machinerie post-traductionnelle complexe des eucaryotes. D'une part, cela peut engendrer une altération fonctionnelle des protéines exprimées par la

perte de modifications post-traductionnelles importantes, telles les N- et O-glycosylations, les acétylations et certaines phosphorylations. Egalement déterminante pour la structure d'une protéine, la formation des ponts disulfures peut être entravée par l'environnement réducteur du cytoplasme bactérien. Le périplasme permet alors de réaliser ces modifications encore faut-il que la protéine nouvellement synthétisée puisse y être acheminée. D'autre part, l'absence de certains lipides essentiels, protéines chaperonnes ou autres enzymes, peut induire un défaut dans le repliement empêchant la protéine d'adopter sa conformation native. Les protéines membranaires mal conformées s'aggrègent et forment alors des corps d'inclusions. Là encore, des stratégies ont été mises en place afin de résoudre ou contourner le problème de la formation de corps d'inclusions telles que la modification des conditions de culture bactérienne (température, temps de culture, concentration d'IPTG) ou la dénaturation/renaturation des protéines agrégées (Sahdev et al., 2007).

L'expression de protéines recombinantes chez *E. coli* reste néanmoins particulièrement limitée pour de nombreuses protéines eucaryotes trop complexes comme en témoigne la faible proportion de PMIs eucaryotes produites via cet hôte (Lyons et al., 2016; He et al., 2014).

ii. Levures

Les systèmes d'expression employant des levures présentent les avantages d'être simples à mettre en œuvre, relativement rapides et peu coûteux pour des rendements de productions conséquents chez un hôte eucaryote. Comme les bactéries, les levures peuvent être manipulées aisément d'un point de vue génétique. Cependant, à défaut d'être secrétées, la purification des PMIs exprimées peut s'avérer plus délicate en raison de risques de protéolyse importants liés à la libération de quantités importantes de protéases renfermées au sein des vacuoles au moment de la lyse cellulaire. Parmi les nombreuses espèces de levures, *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) et *Pichia Pastoris* (*P.Pastoris*) sont les deux souches les plus utilisées pour exprimer des PMIs eucaryotes. *S.cerevisiae* fut le premier système hétérologue à fournir des protéines recombinantes pour des études de biologie structurale (Jidenko et al., 2005; Long et al., 2005). Par la suite, la souche *P.Pastoris* s'est imposée car elle permet de produire des quantités plus importantes de PMIs (Byrne, 2015). En effet, *P.Pastoris* est adapté à une production à grande échelle dans des

bioréacteurs (Cereghino et al., 2002). Ces fermenteurs optimisent la production en contrôlant précisément des paramètres de cultures comme le pH, l'aération et l'apport en source de carbone, permettant ainsi la stabilisation de cultures à haute densité.

Contrairement aux bactéries les levures sont capables d'effectuer la plupart des modifications post-traductionnelles trouvées chez les eucaryotes. Cependant la N- et O-glycosylations des protéines chez la levure diffère de celle des cellules de mammifères par le nombre et le type de groupements ajoutés, principalement des mannoses. Cela peut engendrer des problèmes de repliement des PMIs ou des réactions immunitaires lorsque des glycoprotéines solubles sont produites chez la levure pour des administrations thérapeutiques (Cereghino et al., 2002).

iii. Cellules d'insectes

La transduction de baculovirus dans des cellules d'insectes a permis de développer un système d'expression très performant pour la production de protéines complexes. Au cours des dernières années, les cellules d'insectes ont permis de produire davantage de PMIs eucaryotes qu'aucun autre type d'hôte. Actuellement, les espèces *Spodoptera frugiperda* et *Trichoplusia ni* sont majoritairement utilisées pour l'expression des PMIs humaines (Lyons et al., 2016) dont les récepteurs couplés aux protéines G (Maeda and Schertler, 2013). Comparées aux bactéries et levures, les cellules d'insectes offrent une composition lipidique, un éventail de modifications post-traductionnelles et un repliement des protéines proches de ceux trouvés chez les mammifères. Cela étant, les N-glycosylations opérées par les insectes sont moins complexes que chez les mammifères avec une absence notable de synthèse d'acides sialiques. Ainsi à défaut de pouvoir greffer des glycanes complexes, les cellules d'insectes sont susceptibles de générer des glycoprotéines qui ne sont pas pleinement fonctionnelles. La modification génétique du potentiel de glycosylation des cellules d'insecte peut alors remédier à ce type de limitations (Hollister et al., 2002). Enfin, d'autres inconvénients pratiques sont inhérents à l'utilisation de ces systèmes comme le prix élevé des milieux de culture, le temps et la complexité du procédé, ainsi que des rendements de productions variables d'une protéine à l'autre.

iv. Cellules de mammifères

La nécessité de retrouver certaines modifications post-traductionnelles spécifiques ou un environnement lipidique proche des membranes natives pour optimiser la fonction d'une PMI recombinante, ont motivé le développement des cellules de mammifères comme système d'expression (Andréll and Tate, 2013). Certaines lignées cellulaires comme HEK (Human Embryonic Kidney) ou CHO (Chinese Hamster Ovary) sont ainsi devenues particulièrement populaires pour la production de protéines recombinantes humaines et animales biologiquement actives.

Ces deux lignées peuvent être utilisées soit pour des transfections transitoires soit pour l'élaboration de lignées stables. Une expression transitoire de quelques jours permet généralement de produire, en fonction des expérimentations, un niveau relativement élevé de protéines recombinantes mais variable d'une production à l'autre. L'expression dans des lignées stables permet au contraire de garantir un taux de production propre au clone isolé, mais présente l'inconvénient non négligeable du temps de sélection des lignées stables. Bien que les deux approches se justifient en fonction des contextes d'études, l'expression transitoire au sein de la lignée HEK293SGnTI (N-acetylglucosaminyl-transferase I negative) est à l'origine de la plupart des structures de PMIs eucaryotes déposées sous forme de fichier PDB ces deux dernières années (Lyons et al., 2016). Cette lignée impose une simplification des motifs de glycosylation qui facilite la déglycosylation opérée usuellement avant la cristallographie. Actuellement, les cellules de mammifères sont de plus en plus utilisées pour l'expression recombinante, et ce, en dépit du coût élevé et du rythme de production relativement lent qu'elles imposent.

c. Influence de l'environnement membranaire sur la fonction des PMIs

Quel que soit le système de production utilisé, les PMIs recombinantes nécessitent d'être purifiées en présence de molécules offrant un environnement hydrophobe pour stabiliser leurs segments transmembranaires. Ces molécules de support doivent comporter des domaines polaires afin d'assurer la solubilisation de ce type de structure en milieu aqueux. Des composés amphipatiques tels que les détergents, les mixtures de lipides ou des polymères de type amphiphols, sont ainsi utilisés afin de solubiliser des PMIs recombinantes. De nombreux protocoles de solubilisation ou de reconstitution établis de façon empirique,

ont permis d'obtenir des PMIs fonctionnelles. Cependant ces environnements artificiels ne peuvent mimer la complexité des membranes cellulaires, composées de centaines de molécules lipidiques distinctes, et ne peuvent reproduire les nombreuses propriétés physico-chimiques de la membrane plasmique. Ainsi, entre autres, l'organisation en feuillets plats des bicouches, l'épaisseur moyenne (comprise entre 25 et 35 Å) de leur partie hydrophobe, l'équilibre des tensions au sein de la bicouche, la différence de composition lipidique entre feuillets interne et externe, la présence d'un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane et la prise en charge immédiate des protéines au cours de leur production, sont autant d'éléments qui ne sont pas retrouvés dans les structures micellaires ou les liposomes accueillant des PMIs.

Néanmoins il a été mis en évidence que les PMIs possèdent une certaine robustesse structurale en absence de lipides qui tient au fait que le repliement des PMIs dépend principalement des interactions internes entre différents domaines de la protéine et non de l'environnement membranaire (Popot and Engelman, 2016). En d'autres termes, en occultant le côté dynamique de la conformation tridimensionnelle d'une protéine en interaction avec son environnement lipidique, la bicouche lipidique ne dicte pas forcément le repliement des PMIs car ces dernières possèdent une capacité intrinsèque d'adopter une configuration de repliement adaptée à leur fonction. De nombreux exemples de PMIs dénaturées puis renaturées *in vitro* appuient le concept selon lequel, un certain pourcentage des PMIs sont capables d'adopter une configuration tridimensionnelle fonctionnelle en l'absence de machinerie de biosynthèse cellulaire ou de membranes natives (Popot, 2014).

Cependant, ce repliement robuste des PMIs au sein d'environnements non natifs ne suffit pas à garantir que la protéine se présente, ni ne se comporte exactement comme au sein des membranes natives. Car en dehors du repliement initial, l'environnement lipidique d'une PMI peut avoir, à l'échelle moléculaire, une grande importance sur sa fonction en conditionnant sa structure tertiaire et/ou quaternaire et ce notamment dans le cas des complexes multimériques. Dans les membranes cellulaires, les lipides interagissent à plusieurs niveaux avec une protéine insérée dans les membranes, selon des degrés variables de spécificité structurale (Lee, 2011).

La première couche de lipides au contact de la surface protéique, ou « anneau lipidique » comme pour le canal aquaporine perméable aux molécules d'eau (**Figure 32**), induit de nombreuses interactions dynamiques de faible affinité, mais dont l'effet est

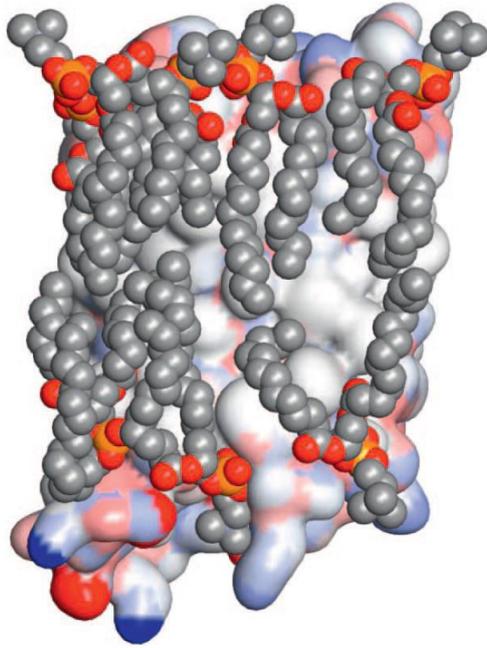


Figure 32 : Liaison de lipides formant un anneau lipidique à la surface d'une aquaporine. La forme des molécules de lipides s'adapte pour épouser la surface irrégulière de la protéine. Les lipides en orange (tête polaires) et gris (chaîne d'acides gras) sont représentés en « space-filling ». La surface de l'aquaporine est colorée selon la charge des atomes, allant du rouge pour les charges négatives au bleu pour les charges positives (d'après Lee. 2011) - Coordonnées fichier PDB : 2B60.

coopératif. A titre d'exemple, il a été rapporté que l'activité de la Ca^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique était réduite dans des bicouches de phosphatidyléthanolamine (PE) comparée à celles de phosphatidylcholine (PC) (Starling et al., 1996). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que dans une bicouche mixte de PE et PC, l'activité n'était pas affectée tant que la proportion de PE n'excédait pas 80%. Ainsi la coopération des lipides occupant la trentaine de sites que présente la Ca^{2+} ATPase à sa surface, pourrait moduler la fonction via des changements conformationnels potentiels. La nature des têtes polaires pour leur propension à former des ponts hydrogène, mais aussi la longueur des chaînes d'acide gras, sont des caractéristiques déterminantes vis-à-vis d'une PMI. La Ca^{2+} ATPase, voit ainsi son activité modulée en fonction du nombre de carbones portés par les chaînes d'acides gras, avec une longueur fonctionnelle optimale comprise entre 16 et 20 carbones (Lee, 2005).

Alors que les lipides annulaires enveloppent les domaines transmembranaires et juxta-membranaires d'une PMI via une majorité de sites peu spécifiques, on trouve également quelques « hot-spot » à la surface de celle-ci, soit des sites de plus haute spécificité liant préférentiellement certains types de lipides. Parmi ces sites, des clusters constitués de résidus chargés positivement, localisés au niveau des interfaces entre milieu et bicouche, attirent plus spécifiquement des phospholipides anioniques. Ce type d'interaction peut avoir des répercussions fonctionnelles sur des protéines comme pour le canal mécano-sensible de large conductance de *E. coli* (Powl et al., 2008), le canal potassique Kir2.2 de poulet (Tao et al., 2009) ou encore une fois la pompe Ca^{2+} ATPase (Brini et al., 2010).

Un troisième type d'interaction, encore plus spécifique, a lieu non pas en surface de la protéine mais au cœur des segments hydrophobes, mobilisant des lipides non-annulaires, dits « enfouis ». Ces lipides logés dans les interstices de la protéine influencent sa structure au sein de la bicouche, ce qui leur confère un rôle fonctionnel de premier ordre. De nombreuses PMIs organisent leurs domaines transmembranaires en faisceaux d'hélice- α , lesquelles doivent garder une certaine flexibilité structurale entre elles pour assurer des variations d'inclinaison, d'enroulement, ou des torsions nécessaires à une fonction optimale. Dans une étude portant sur le canal potassique KcsA de *Streptomyces Lividans*, il a été montré que l'ouverture du canal était dépendante de la liaison de plusieurs lipides anioniques sur des sites non-annulaire de la structure homo-tétramérique (Marius et al., 2008).

Enfin, il faut considérer le cholestérol comme un lipide ayant une importance singulière au sein des bicouches. Les molécules de cholestérol ont été décrites comme des composants majeurs des feuilletts membranaires externes formant des interactions directes avec les PMIs. Par ailleurs, la rigidité structurale du cholestérol est connue pour réduire la mobilité des phospholipides environnants, ce qui a initialement amené certains auteurs à penser que l'influence du cholestérol sur les PMIs résultait uniquement de ses effets mécaniques sur la bicouche. Il apparaît désormais que les effets du cholestérol sur les PMIs découlent plus probablement d'interactions directes, lesquels sont capables de moduler et d'affecter la liaison de ligands sur de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (Lee, 2011). Les structures cristallines obtenues pour le récepteur β 2-adrénergique humain (Hanson et al., 2008) et la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ des glandes rectales de requin (Shinoda et al., 2009) ont montré que des molécules de cholestérol se liaient à la structure protéique, avec des conséquences fonctionnelles non négligeable dans le cas de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

En somme, les membranes natives offrent l'environnement le plus favorable à la fonction des PMIs car celles-ci ont évoluées afin que leur structure s'y adapte parfaitement. De ce fait, la reconstitution dans des liposomes ou la solubilisation en présence de détergent peut perturber le fonctionnement d'une PMI recombinante en dépit d'un repliement correct pendant la production. L'intérêt de travailler avec du matériel biologique natif se justifie alors pleinement dans les études fonctionnelles.

2. Les exosomes

a. Une nomenclature perfectible

Les exosomes sont une catégorie de vésicules extra-cellulaires (VEs). Ces vésicules membranaires sécrétées par les cellules peuvent être scindées en deux catégories avec les exosomes d'une part et les ectosomes d'autre part (Cocucci and Meldolesi, 2015). La première correspond à des vésicules intraluminales (VILs) d'origine endosomales, de petite taille (40-100 nm) sécrétées dans le milieu extérieur par fusion des corps multivésiculaire (CMV) avec la membrane plasmique. La seconde comprend toutes les vésicules formées directement par bourgeonnement externe de la membrane plasmique et dont le diamètre

varie entre 50 et 1000 nm. Ces deux types de vésicules, et notamment les ectosomes, sont désignées sous différentes appellations. Dans la littérature, on retrouve notamment les termes de « microvésicules », «shedding vesicles », « microparticles », « nanoparticles », « exosomes-like-vesicles », « oncosomes », « prostatasomes », « tolérosomes », soit autant d'appellations susceptibles de semer la confusion dans la nomenclature des VEs. Cette confusion s'est d'autant plus répandue au sein de la littérature que des vésicules de la taille des exosomes, mais bourgeonnant depuis certains domaines de la membrane plasmique, se sont vues attribuées de manière erronée l'appellation d'exosomes (Booth et al., 2006).

Les critères permettant de définir précisément une vésicule comme un exosome sont encore variables selon les auteurs si bien qu'aucune définition stricte ne fait consensus au sein de la communauté (Gould and Raposo, 2013). Certains groupes définissent les exosomes en fonction de leur biogénèse d'autres considèrent en priorité la fonction physiologique de ces VEs alors qu'une troisième définition se base sur la méthode de purification de ces VEs. Par conséquent, la nomenclature imparfaite des exosomes regroupe toujours potentiellement plusieurs sous-types de VEs qui n'ont pas encore été clairement discriminées.

b. Découverte des exosomes

Avant d'être mises en évidence, les VEs étaient initialement confondues avec des débris cellulaires ou des corps apoptotiques, particules membranaires dont l'existence avait déjà été établie (Kerr et al., 1972). C'est donc assez tardivement que les VEs et particulièrement les exosomes furent identifiés.

Au début des années 1980, E. Trams et ses collaborateurs mesurent l'activité enzymatique de la 5'-nucleotidase dans une préparation hétérogène de microvésicules provenant de cellules néoplasiques. Dans cette étude, ils proposent pour la première fois le terme « exosomes » (Trams et al., 1981) pour des particules d'environ 40 nm (**Figure 33, panel B**), sédimentables à 200 000 x g. Cependant, faute d'investigation sur leur origine subcellulaire, ces auteurs ont proposé que ces vésicules provenaient de la membrane plasmique.

Il a fallu attendre les travaux respectifs des groupes de P. Stahl et R. Johnstone, qui ont mis en évidence l'origine endosomale de certaines nanovésicules secrétées par des réticulocytes en cours de différenciation (Harding et al., 1983; Pan and Johnstone, 1983).

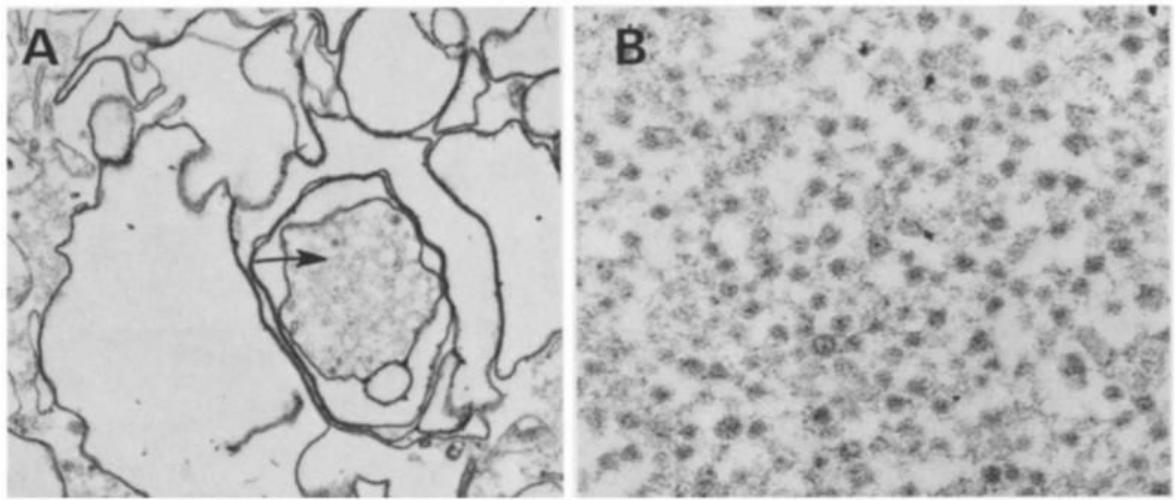


Figure 33 : Observation de VEs en microscopie électronique. (A) VEs sédimentées à partir du surnageant de cellules gliomales de rat mises en culture (grossissement x 33 600). La flèche indique la présence de petites vésicules au sein d'un organelle. (B) La population de petites vésicules à plus fort grossissement (grossissement x 78 400 ; d'après Trams et al. 1981).

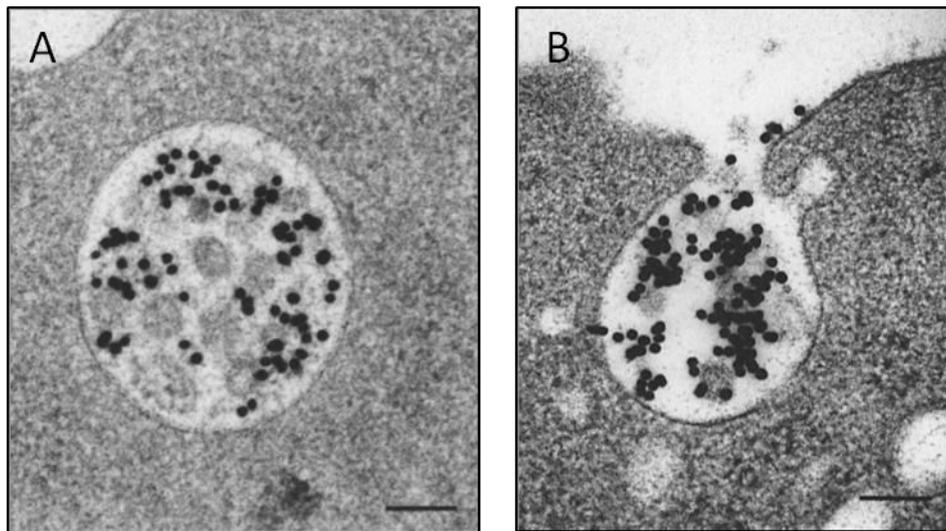


Figure 34 : Observation en microscopie électronique de VILs et d'exosomes. Les points noirs intenses correspondent au marquage à l'or colloïdal ciblant les TfRs adressés dans les VILs. Avant la fusion du compartiment à la membrane plasmique (gauche, barre d'échelle : 100 nm), des VILs sont visualisées à l'intérieur d'un MVB. Après fusion du MVB à la membrane plasmique (droite, barre d'échelle : 100 nm) (d'après Harding et al. 1983).

Ces auteurs examinèrent l'internalisation du récepteur de la transferrine (TfR) dans les compartiments intracellulaires, en utilisant un marquage à l'or colloïdal de la transferrine ou d'un anticorps dirigé contre le TfR. Leurs observations en microscopie électronique montrèrent que les TfRs transitaient par les compartiments endosomaux, et notamment les CMVs, avant de s'accumuler à la surface de petites VILs contenues au sein des CMVs (**Figure 34, panel A**). Ils observèrent également un phénomène de fusion des CMVs à la membrane plasmique, responsable de la libération de VILs de 50 nm de diamètre dans le milieu extracellulaire (**Figure 34, panel B**). Bien que ne figurant dans aucune des deux études, le terme « exosome » désignera par la suite ces VEs sécrétées à partir des CMVs et mesurant entre 40 et 100 nm de diamètre.

La sécrétion d'exosomes fut ensuite observée *in vitro* à partir de nombreux types cellulaires, et notamment les cellules d'origine hématopoïétique comme les lymphocyte B (Raposo et al., 1996), les lymphocytes T (Blanchard et al., 2002), les mastocytes (Raposo et al., 1997), les cellules dendritiques (Zitvogel et al., 1998), et les plaquettes (Heijnen et al., 1999). De façon similaire, des exosomes produits par des macrophages (Qu et al., 2009), des neurones (Fauré et al., 2006), des oligodendrocytes (Krämer-Albers et al., 2007), des cellules de Schwann (Février and Raposo, 2004), des cellules épithéliales intestinales (Van Niel et al., 2001), ou des cellules tumorales (Wolfers et al., 2001) ont également été décrits.

Enfin, des vésicules portant certaines caractéristiques exosomales ont été isolées à partir de différents fluides biologiques comme le sang (Caby, 2005), les urines (Pisitkun et al., 2004), la salive (Ogawa et al., 2011), le liquide amniotique (Asea et al., 2008), le lait maternel (Admyre et al., 2007), la bile (Masyuk et al., 2010), le sperme (Ronquist and Brody, 1985), et le liquide céphalo-rachidien (Vella et al., 2007).

c. Caractéristique et propriétés des exosomes

A défaut d'une réelle définition stricte et officielle, de nombreux auteurs s'accordent à décrire les exosomes selon un ensemble de caractéristiques qui peuvent, pour certaines, être partagées par plusieurs types de VEs. Par exemple, la taille caractéristique des exosomes est comprise entre 40 et 100 nm (Raposo and Stoorvogel, 2013; Théry et al., 2006). Certains auteurs mesurent des tailles un peu plus élevée allant jusqu'à 150 nm

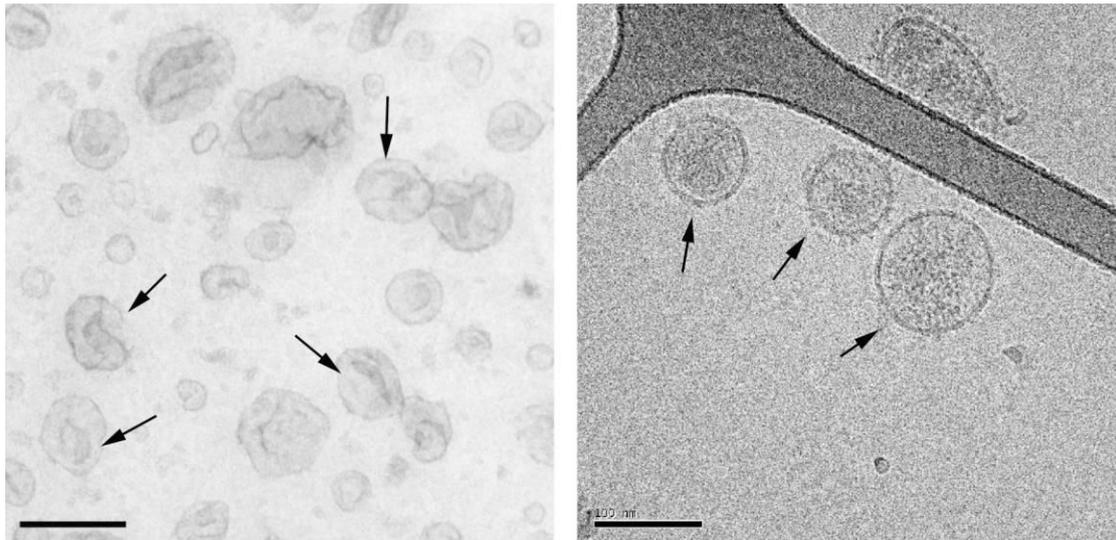


Figure 35 : Différences d'aspect des exosomes en microscopie électronique en fonction du protocole de préparation employé. En microscopie électronique (gauche, barre d'échelle : 100 nm), le traitement de la préparation avec de l'acétate d'uranyle pour le contraste suivi d'un montage utilisant de la méthylcellulose provoquent une altération de structure des exosomes apparaissant alors sous une forme artificielle de coupelle. En microscopie cryo-électronique (droite, barre d'échelle : 100 nm), en l'absence de ces traitements, les exosomes visualisés présentent une forme sphérique (d'après Raposo & Stoorvogel. 2013).

(Colombo et al., 2014; Leblanc et al., 2017; Sokolova et al., 2011), valeurs chevauchant celles de certains types d'ectosomes (Bobrie et al., 2011).

Au niveau morphologique, les exosomes ont pu être décrits au départ comme présentant une forme de coupelle, et ce, en raison d'un aspect de « ballon crevé » visualisé en microscopie électronique (**Figure 35, panel gauche**). Or, cet aspect singulier s'est avéré par la suite être créé artificiellement par la fixation chimique et le traitement de contraste (Raposo and Stoorvogel, 2013). Ainsi, d'autres observations en microscopie cryo-électronique (**Figure 35, panel droite**) à partir d'exosomes directement congelés révèlent bien une forme de vésicule sphérique assez classique.

Les principales méthodes de purification établies pour les exosomes se basent sur un protocole de centrifugations différentielles (**Figure 36**) reposant sur le fait que ces vésicules sédimentent à partir de 100 000 x g. Un degré de purification supplémentaire peut être obtenu en incluant des étapes de filtration et/ou de centrifugation sur gradient de sucrose sachant que les exosomes ont une densité comprise entre 1,15 et 1,19 g/ml (Théry et al., 2006). Néanmoins il est admis que quelque soit la méthode de purification utilisée, les préparations obtenues ne contiennent pas exclusivement des exosomes (Colombo et al., 2014) et il n'y a pas de méthode physique permettant de discriminer entre les exosomes et les microvésicules de la même taille.

Le processus de bourgeonnement interne des membranes endosomales, qui caractérise la biogénèse des exosomes constitue une caractéristique majeure de ce type de vésicules. Ce mécanisme permet de retrouver dans la membrane exosomale des protéines membranaires dans la même orientation qu'à la surface cellulaire (**Figure 37**) ainsi que des marqueurs spécifiques des CMVs, bien que ceux identifiés jusqu'à présent ne soient pas suffisants à eux seuls pour caractériser spécifiquement les exosomes.

d. Composition moléculaire des exosomes

Les exosomes ont une composition moléculaire complexe incluant des protéines, des lipides, des acides nucléiques et autres métabolites. Dans l'espoir d'identifier des marqueurs représentatifs des exosomes, de nombreuses études se sont intéressées à leur composition protéique. Ainsi des exosomes provenant de diverses sources cellulaires ont été caractérisés au moyen de techniques telles que l'immunocytochimie combinée à la microscopie

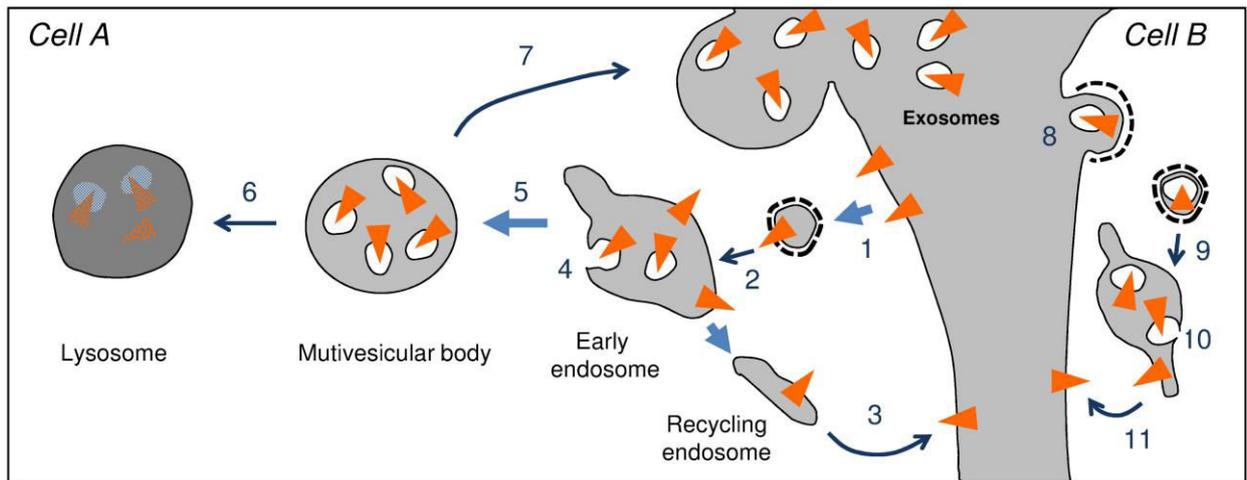


Figure 37 : Schéma du transport de protéines membranaires au travers de différents compartiments cellulaires et leur adressage exosomal permettant leur transfert d'une cellule sécrétrice à une cellule receveuse. Dans la cellule sécrétrice (Cell A) les protéines membranaires exprimées à la membrane plasmique (1) sont internalisées via des vésicules de recyclage (2) qui sont dirigées vers les endosomes précoces (Early endosome). De là, certaines de ces protéines pourront être recyclées à la membrane plasmique (3) en passant par des endosomes de recyclage (Recycling endosome). A partir des endosomes précoces, un autre contingent de protéines se retrouve internalisé dans des VILs suite au bourgeonnement interne d'une portion de membrane endosomale (4).. Les endosomes accumulant de nombreuses VILs (5) forment les corps multivésiculaires (Multivésicular body) qui peuvent se diriger par la suite soit vers la voie lysosomale (6) soit vers une voie sécrétrice (7) pour libérer les VILs à l'extérieur de la cellule sécrétrice. Les exosomes ainsi sécrétés peuvent être ensuite internalisés par une cellule receveuse (Cell B) par internalisation dans des vésicules à clathrine qui rejoindront des endosomes précoces (9). Dans ces compartiments les exosomes capturées fusionnent avec la membrane endosomale (10) pour permettre aux protéines de gagner la membrane plasmique (11) en empruntant la voie de recyclage (d'après Chivet et al. 2012).

électronique, le Western Blot ou la spectrométrie de masse (Clayton et al., 2001; Fauré et al., 2006; Février et al., 2004; Van Niel et al., 2001; Wubbolts et al., 2003). Ces études montrent que les exosomes contiennent des marqueurs endosomaux, des marqueurs communs aux autres VEs (**Figure 38**), ainsi que des protéines spécifiques du type cellulaire dont ils sont issus, incluant des protéines de la membrane plasmique et des protéines du cytosol.

Parmi les protéines présentes dans tous les types d'exosomes on retrouve des constituants du cytosquelette (actine, tubuline, myosine, clathrine), des protéines chaperonnes (Hsc70, Hsp90), des sous-unités de protéines-G trimériques, des enzymes et des facteurs d'élongation (Février and Raposo, 2004). Des protéines comme les SNAREs, les annexines, les Rab GTPase, ainsi que les flotillines et cavéolines sont également présentes et témoignent de l'origine endosomale de ces vésicules (Raposo and Stoorvogel, 2013). De même les protéines ALIX et Tsg101 qui appartiennent à la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) sont considérées comme d'authentiques marqueurs exosomaux en raison de leur implication dans le processus de biogénèse des exosomes (van Niel, 2006). Enfin les membranes exosomales sont très enrichies en molécules d'adhésion de type tétraspanines dont CD81, CD82, CD63 et CD9 qui sont parmi les plus représentées.

En dehors de cet équipement basal, on trouve dans les exosomes d'autres protéines spécifiques du type cellulaire les sécrétant. Par exemple, des molécules des complexes majeurs d'histocompatibilité 1 et 2 sont exprimées en surface d'exosomes issus des cellules présentatrices d'antigènes (Clayton et al., 2001). Les TfRs sont propres aux exosomes de réticulocytes (Harding et al., 1983; Pan and Johnstone, 1983) et les sous unités 2 et 3 des récepteurs au glutamate (GluR2 et 3) sont spécifiques à certains exosomes neuronaux (Lachenal et al., 2011). En outre, différents types d'intégrines ou de tétraspanines exprimées à la surface des exosomes semblent aussi être déterminés par la nature de la cellule sécrétrice (van Niel, 2006).

Concernant les lipides constitutifs des exosomes, bien que peu de données aient été reportées, quelques études ont néanmoins montré que les membranes exosomales possédaient une composition particulière. En effet, dans les exosomes sécrétées par des lymphocytes B (Wubbolts et al., 2003), des cellules dendritiques ou les mastocytes (Laulagnier et al., 2004) un enrichissement en cholestérol, sphingomyeline et en gangliosides

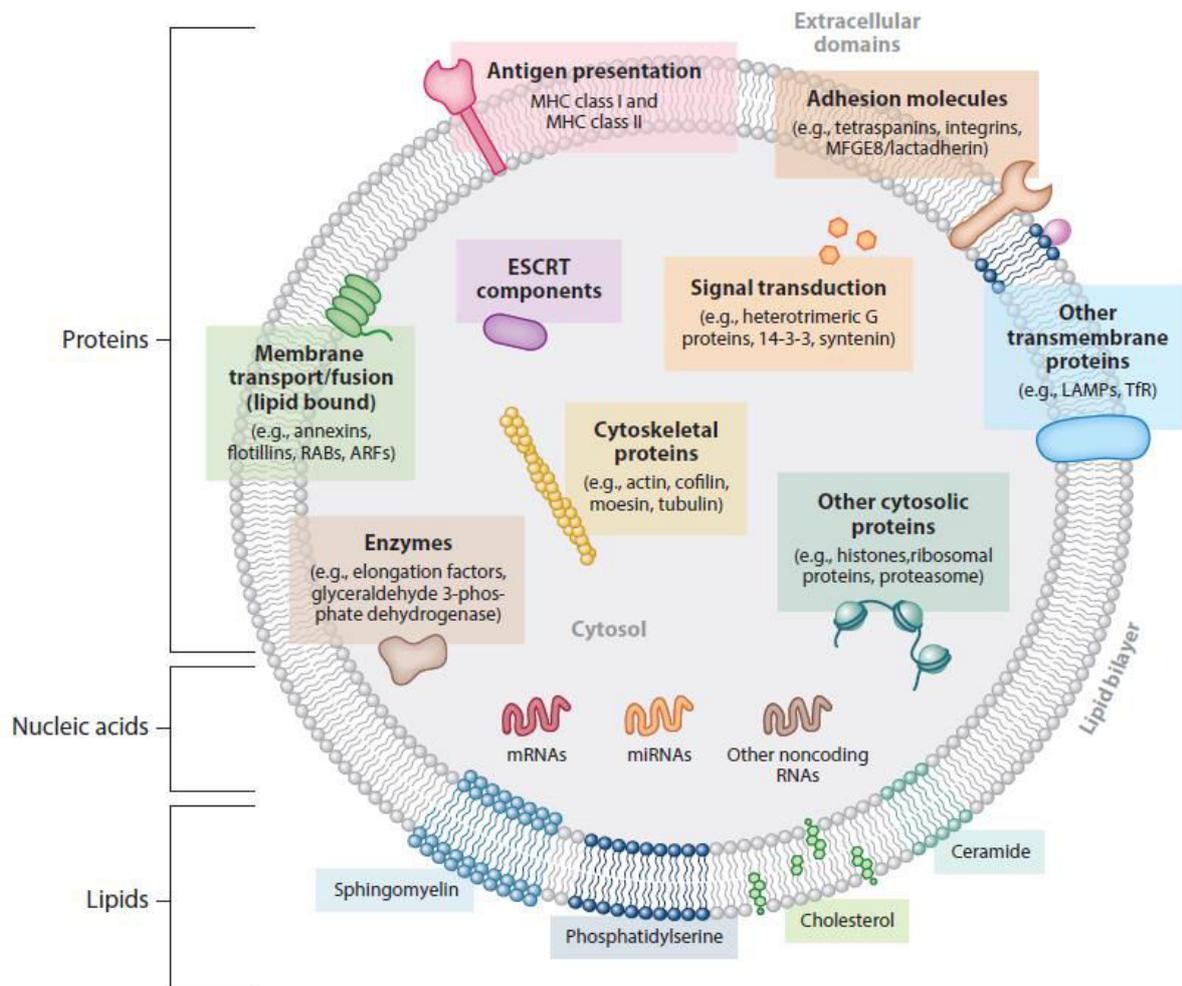


Figure 38 : Schéma de la composition globale des VE en protéines, lipides et acides nucléiques. Les différents types de composants affichés peuvent être exclusifs à une catégorie de VE. Dans les exosomes en particulier, certaines tétraspanines sont bien représentées comme CD9, CD63 et CD81. Des protéines de la machinerie ESCRT tels que Tsg101 ou ALIX sont également considérés comme des marqueurs d'exosomes. D'autres composants comme les complexes CMH sont spécifiques d'exosomes provenant des cellules présentatrices d'antigène. Enfin certains éléments indiqués comme les histones, le proteasome ou les protéines ribosomales sont davantage retrouvés dans les microvésicules ou ectosomes que dans les exosomes (d'après Colombo et al.. 2014).

de type GM3 a pu être observé, soit des lipides généralement associés aux radeaux lipidiques. Cette composition lipidique semblable à celle des radeaux lipidiques (De Gassart, 2003; Skotland et al., 2017) est tout à fait cohérente avec la présence de protéines exosomales communément associées à ces domaines lipidiques, comme les flotilines et les tétraspanines. Par ailleurs les exosomes présentent de la phosphatidyl-sérine à leur surface, lipide qui est associé majoritairement au feuillet interne de la membrane plasmique (Colombo et al., 2014).

Des acides nucléiques sont également présents au sein des exosomes. Une étude *in vitro* réalisée à partir de lignées de mastocytes humains (HMC-1) et murins (MC/9) a révélé la présence d'ARN messagers et de micro ARNs (miRNA) au sein des exosomes sécrétés (Valadi et al., 2007). Les auteurs évaluèrent environ 1300 ARNms dans ces cellules sécrétrices, avec un enrichissement notable dans les exosomes. De plus, ils ont montré que les ARNms exosomaux étaient toujours capables d'être traduits après leur transfert dans une cellule receveuse. Des ARNs ont aussi été retrouvés dans des exosomes provenant de fluides biologiques comme la salive (Michael et al., 2010) ou le sang (Rabinowits et al., 2009) suggérant que le transfert d'ARN *in vivo* via les exosomes avait une signification physiopathologique. Plus récemment, d'autres types d'ARNs non codants ont été identifiés dont des petits ARN interférents, des ARNs de voûte, des ARN-Y et des ARNs de transfert (Nolte-t Hoen et al., 2013). Ces différents ARNs remplissent des fonctions spécifiques au sein de la cellule. Les ARNs interférents associées aux complexes RISC (RNA-induced silencing complex) entravent la traduction de certains ARNms en se liant spécifiquement sur des séquences cibles par complémentarité de bases nucléotidiques. Les protéines des complexes RISC provoquent des coupures au niveau de la séquence ciblée et les deux fragments de l'ARNm sont ensuite dégradés par des exonucléases. Les ARN de voûte sont des constituants des particules ribonucléoprotéiques en voûte que l'on trouve associées aux pores nucléaires. Les ARN-Y représentent des facteurs d'initiation de la réplication d'ADN et les ARNs de transfert sont impliqués dans la traduction des ARNms où ils apportent au ribosome des acides aminés spécifiques pour chaque codon lors de la synthèse peptidique. La plupart des ARNs présents dans les exosomes sont davantage enrichis dans ces vésicules que dans le reste de la cellule, suggérant un mécanisme d'adressage sélectif de certains ARNs destinés à la communication intercellulaire (Nolte-t Hoen et al., 2013; Valadi et al., 2007).

Enfin, dans le but de faciliter l'accès aux nombreuses informations concernant la composition moléculaire des exosomes, les données de la littérature sont depuis quelques années centralisées dans des bases de données telles que « ExoCarta » (Mathivanan et al., 2012) ou « Vesiclepedia » (Kalra et al., 2012).

e. Biogénèse des exosomes

En tant que vésicules originaires des CMVs, la biogénèse des exosomes relève d'une première étape de bourgeonnement interne responsable de la formation des VILs. Une seconde étape consiste en la sécrétion de ces VILs dans le milieu extracellulaire, consécutivement à la fusion des CMVs avec la membrane plasmique.

i. Corps multivésiculaires

Dans la cellule, les CMVs correspondent à des compartiments endosomaux issus des endosomes précoces, et faisant office de carrefour entre les voies de dégradation lysosomale et de sécrétion exosomale (**Figure 39**). Les CMVs impliqués dans la sécrétion exosomale sont enrichis en cholestérol (Möbius et al., 2002). Par ailleurs, l'observation en microscopie électronique du cholestérol via un marquage avec la perfringolysine O, montre qu'il se localise majoritairement dans les VILs et non pas à la surface des CMVs. Ces observations sont cohérentes avec le fait que les membranes exosomales sont décrites comme étant riches en cholestérol. A l'inverse, l'acide lyso-phosphatidique, marqueur des endosomes tardifs, est absent des exosomes (Wubbolts et al., 2003) alors qu'il est retrouvé dans une sous-population de CMVs destinée aux lysosomes (White et al., 2006).

ii. Machinerie ESCRT

La machinerie moléculaire responsable de la formation des CMVs a été initialement caractérisée pour la voie lysosomale, par transposition de résultats obtenus chez la levure. Ces travaux portant sur des mutants déficients pour le transport de matériel vers la vacuole (compartiment analogue aux lysosomes chez la levure), ont mené à l'identification de plusieurs gènes impliqués dans cette fonction (Bryant and Stevens, 1998). Très conservés pendant l'évolution, des gènes hétérologues ont alors été retrouvés chez les métazoaires et

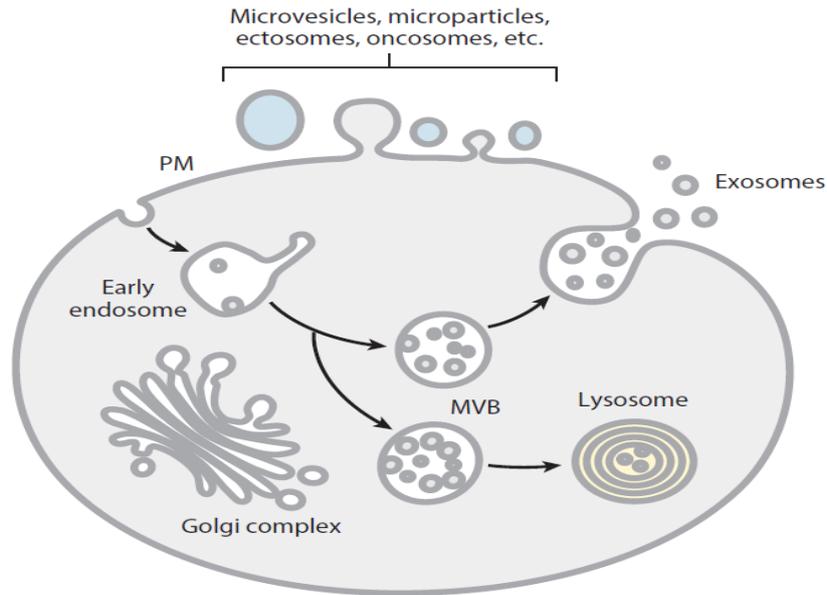


Figure 39 : Schéma de la double fonction des corps multvésiculaires (CMVs). La formation de deux sous-populations de CMVs (MVB) intervient après l'endosome précoce (Early Endosome). Une première population de CMVs fusionne avec la membrane plasmique pour sécréter des exosomes. A la différence des exosomes libérés dans le milieu extracellulaire, les ectosomes (Microvesicles et autres dénominations) sont formés directement par bourgeonnement de la membrane plasmique. Une deuxième population de CMVs est dirigée vers le lysosome pour dégrader certains cargos (d'après Colombo et al.. 2014).

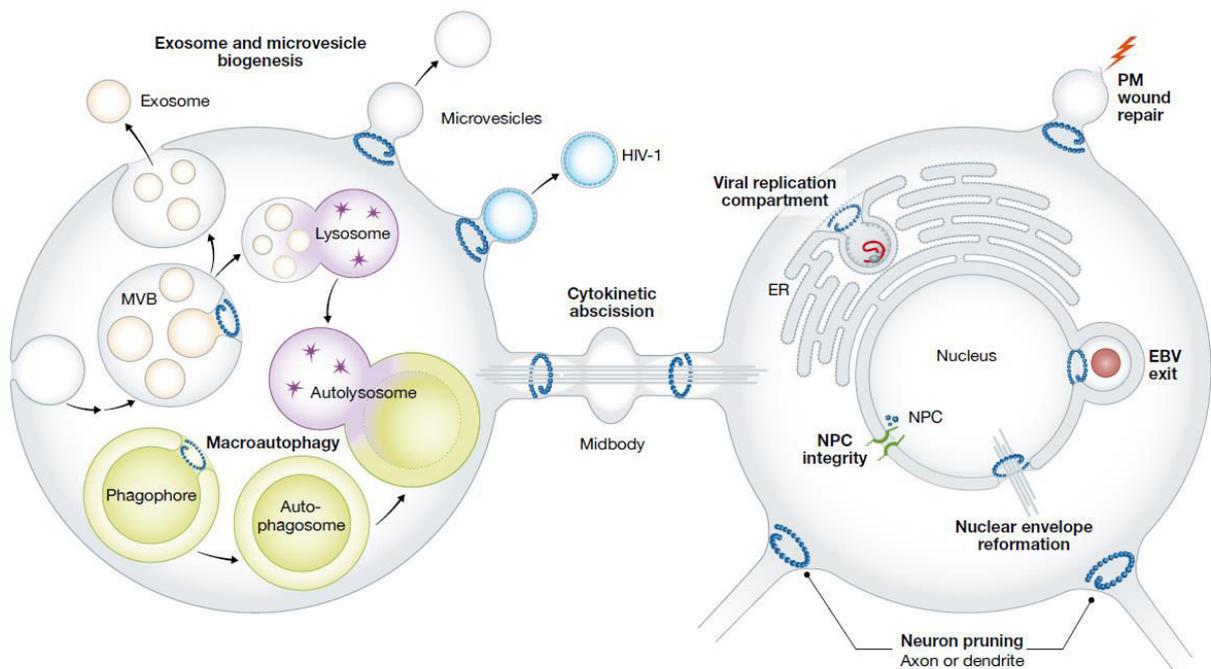


Figure 40 : Représentation de l'implication de la machinerie ESCRT (colliers bleus) dans différents processus cellulaires (d'après Hurley. 2015).

chez l'homme. Ainsi pour de nombreuses espèces, ces gènes codent pour les sous-unités des complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Ces complexes protéiques coopèrent pour former une machinerie impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la cytodérèse, l'autophagie, la réplication virale, et la réparation des dégâts subis à la membrane plasmique (Hurley, 2015) (**Figure 40**). Classiquement on décrit quatre complexes au sein de la machinerie ESCRT : ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III, ainsi que quelques protéines accessoires. Un cinquième complexe ESCRT-IV est également cité par certains auteurs comme étant composé par quelques-unes de ces protéines accessoires intervenant en aval dans la voie ESCRT (**Tableau 5**).

Le complexe ESCRT-0 (**Figure 41**) est un hétérodimère composé de STAM (Signal Transducing Adaptor Molecule 1 ou 2 chez l'Homme, Hse1 chez la levure) et Hrs (Hepatocyte Growth Factor Regulated Kinase Substrate, Vps27 chez la levure). Dans la cellule, le complexe s'associe aux endosomes précoces via une interaction de haute affinité entre le domaine FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 EEA1) de Hrs et le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) (Raiborg et al., 2001; Stahelin et al., 2002), lipide particulièrement enrichi dans les membranes endosomales. ESCRT-0 possède également plusieurs domaines de liaison à l'ubiquitine, notamment sur la sous-unité Hrs (Hirano et al., 2006). Ainsi, au niveau des endosomes le complexe lie des protéines ubiquitinylées, contribuant de cette façon à la sélection des cargos. De plus, les sous-unités d'ESCRT-0 peuvent aussi s'associer à la clathrine, laquelle forme un manteau plat à la surface endosomale (Raposo et al., 2001). Les microdomaines ainsi formés autour des sous-unités Hrs rassemblent les cargos en vue d'un bourgeonnement qui sera induit par le recrutement supplémentaire du complexe ESCRT-I. Une interaction directe entre la sous-unité Tsg101 de ce dernier et un motif PxxP de Hrs a notamment été mise en évidence (Bache et al., 2003).

Le complexe ESCRT-I (**Figure 42**) est un hétérotétramère formé par Tsg101 (Vps23 chez la levure), Vps28 (Vps28 chez la levure), un des quatre isoformes de Vps37 (A à D chez l'homme, Vps37 unique chez la levure) et une des trois sous-unités de Mvb12 (Mvb12 A, B ou UBAP1 chez l'homme, Mvb12 chez la levure). Le complexe ESCRT-I recruté par ESCRT-0 peut lui aussi participer au recrutement des cargos ubiquitinylés par l'intermédiaire du domaine ubiquitine E2 variant (UEV) de Tsg101 (Sundquist et al., 2004). Ce domaine UEV est également celui impliqué dans la liaison avec la sous-unité Hrs précédemment citée. Dans la voie ESCRT canonique, Vps28 recrute la sous-unité Vps36 de ESCRT-II pour former un double

Metazoan protein	Yeast protein	Interacting partners	Motifs/domains
ESCRT-0			
Hrs	Vps27	PI3P, Ubiquitin, Tsg101, STAM, Clathrin	VHS, FYVE, DUIM, PxxP, CC, CB
STAM 1,2	Hse1	Ubiquitin, DUBs, Hrs	VHS, UIM, SH3, CC
ESCRT-I			
Tsg101	Vps23	Hrs, Alix, Ubiquitin, Cep55, Mvb12, Vps28, Vps27	UEV, PRR, CC
Mvb12 A,B; UBAP1	Mvb12	PS, Tsg101, Vps37, Ubiquitin (yeast/UBAP1)	MABP, UMA
Vps37 A,B,C,D	Vps37	Tsg101, Mvb12, Acidic Phospholipids	NTD, PRR
Vps28	Vps28	Tsg101, Vps36	CTD
ESCRT-II			
Vps36 (EAP45)	Vps36	PI3P, Ubiquitin, Vps28, Vps22, Vps25	GLUE, WH, NZF (yeast)
Vps22 (EAP30)	Vps22	Acidic Phospholipids, Vps25, Vps36	HD, WH
Vps25 (EAP20)	Vps25	Vps22, Vps36, Vps20	WH
ESCRT-III (Core Components)			
hVps20 (CHMP6)	Vps20	Vps25, Vps32, Vps4	MIM2
hVps32 (CHMP4 A,B,C)	Vps32 (Snf7)	Vps20, Vps24, Vps4, Alix, CHMP7, DUBs	MIM2
hVps24 (CHMP3)	Vps24	Vps32, Vps2, Vps4, Did2, PI3,5P2, DUBs	MIM1
hVps2 (CHMP2 A,B)	Vps2	Vps24, Vps4, Did2	MIM1
ESCRT-III (Additional Factors)			
hDid2 (CHMP1 A,B)	Did2 (Vps46)	Ist1, Vps4, Vta1, Vps24, Vps2, DUBs, Spastin	MIM1
Ist1	Ist1	Vps4, Did2, Vta1	MIM1, MIM2
hVps60 (CHMP5)	Vps60 (Mos10)	Vta1, Vps4	Unclassified MIM
CHMP7	-	CHMP4B	MIM1, MIM2
ESCRT-IV			
Vps4 A,B (SKD1)	Vps4	Vps20, Vps32, Vps24, Vps2, Did2, Vta1, Ist1, Vps60	MIT, AAA, β -Domain
LIP5	Vta1	Vps4, Vps60, Did2, Ist1, Vps20, Vps32, Vps24, Vps2	MIT, VSL
Accessory			
Alix (AIP1)	Bro1 (Vps31)	Tsg101, Vps32, Cep55, DUBs	Bro1, PRR

Tableau 5 : Liste des sous unités composant les différents complexes ESCRT et protéines associées chez les métazoaires et la levure (colonnes de gauche). les partenaires impliqués dans ces complexes ainsi que leurs domaines d'interaction sont indiqués (d'après Schuh & Audhya. 2014).

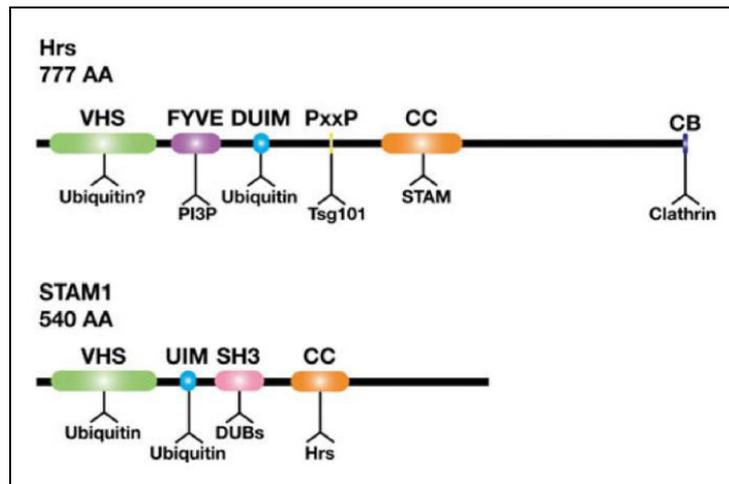


Figure 41 : Les différentes sous unités composant le complexe ESCRT-0. Les domaines de liaisons sont indiqués en gras au-dessus de la ligne représentant la séquence. Les partenaires respectifs sont figurés en dessous de la séquence (Schuh & Audhya. 2014)

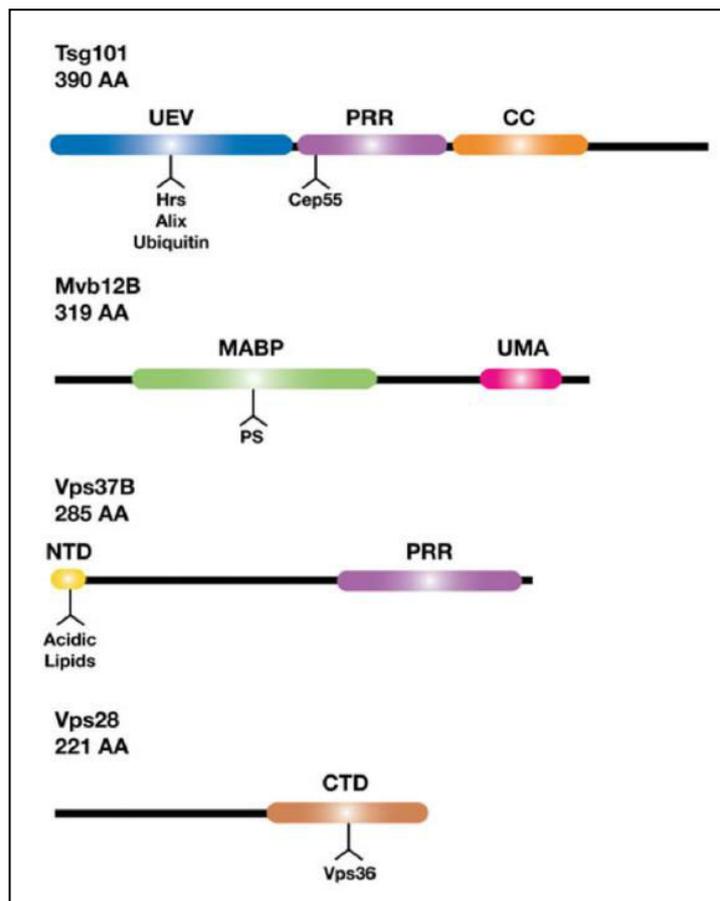


Figure 42 : Les différentes sous unités composant le complexe ESCRT-I. Même représentation qu'en figure 41 (Schuh & Audhya. 2014).

complexe ESCRT-I/ESCRT-II fonctionnel (Babst et al., 2002). En effet, des mutations introduites dans la séquence de Vps36 affectant la formation du complexe ESCRT-I/ESCRT-II, provoquent un défaut d'adressage des cargos chez la levure (Gill et al., 2007). La sous unité Tsg101 apparaît comme un élément crucial dans la stabilité d'ESCRT-I, si bien que sa déplétion entraîne une perte de fonction du complexe entier (Bache et al., 2004). Enfin, le complexe ESCRT-I situé plutôt en amont dans la voie ESCRT peut aussi lier d'autres partenaires comme le complexe ESCRT-III ou la protéine ALIX. ALIX (Bro1 chez la levure) est une protéine accessoire du système ESCRT, impliquée à la fois dans le regroupement des cargos et la formation des VILs (Baietti et al., 2012).

Le complexe ESCRT-II (**Figure 43**) correspond à un hétérotétramère associant les sous unités Vps22/EAP30 (Vps22/Snf8 chez la levure) et Vps36 (Vps36 chez la levure) à deux sous unités Vps25 (Vps25 chez la levure). A l'instar des complexes ESCRT-0 et ESCRT-I, ESCRT-II peut lier l'ubiquitine via le domaine GLUE de Vps36. Ce domaine est aussi impliqué dans les interactions d'ESCRT-II avec les molécules de PI3P et le complexe ESCRT-I. Chez la levure, les deux sous unités Vps25 recrutent chacune une sous unité Vps20 du complexe ESCRT-III de telle sorte qu'ESCRT-II représente au sein de la voie ESCRT, un intermédiaire connectant ESCRT-I et ESCRT-III, facilitant le recrutement de ce dernier (Teis et al., 2010).

Le complexe ESCRT-III est composé des sous unités hVps2/CHMP2 (A ou B), hVps20/CHMP6, hVps24/CHMP3, hVps32/CHMP4 (A, B ou C) (respectivement Vps2, Vps20, Vps24, Vps32/Snf7) auxquelles s'ajoutent les facteurs additionnels hDid2/CHMP1 (A ou B), Ist1, hVps60/CHMP5, CHMP7 (respectivement Did2/Vps46, Ist1, Vps60/Mos10, pour ceux représentés chez la levure). A la différence des autres complexes intervenant en amont, ESCRT-III est constitué de sous unités monomériques solubles qui s'assemblent uniquement à la surface de l'endosome. Des données obtenues chez la levure montrent qu'une fois recrutées par ESCRT-II, les sous unités Vps20 induisent l'oligomérisation des sous unités Snf7 présentes en abondance, pour former des structures en filaments responsables de la séquestration des cargos. Les sous unités Vps24 puis Vps2 s'associent ensuite de manière séquentielle pour finaliser la polymérisation de Snf7 et recruter d'autres partenaires tels que Vps4, une ATPase de type AAA (ATPase Associated with diverse cellular Activities) (Teis et al., 2008; Hanson and Cashikar, 2012). Durant le processus de séquestration, les cargos regroupés dans les invaginations membranaires sont dé-ubiquitinylés par l'enzyme Doa4 avant que la vésicule ne bourgeoine. Concernant le mécanisme d'action d'ESCRT-III sur la

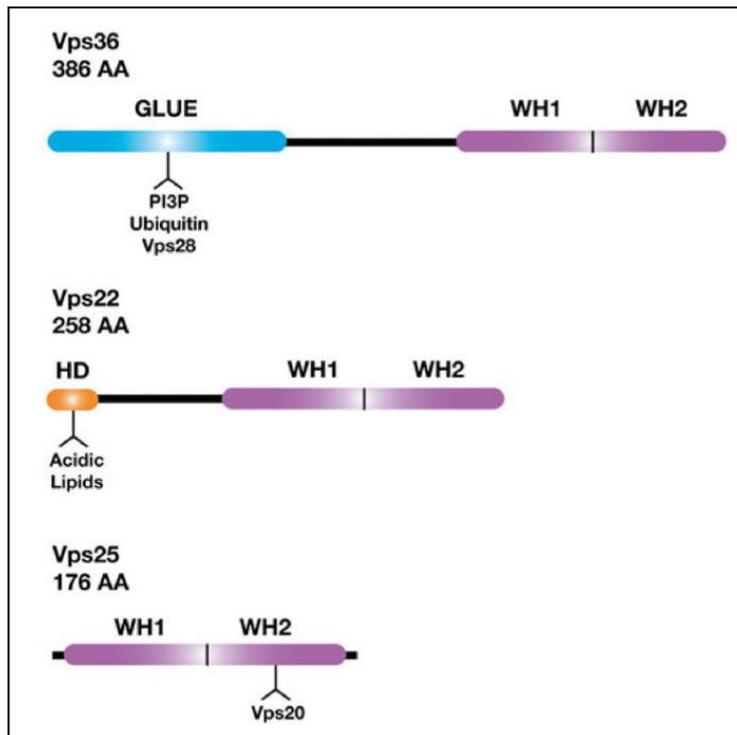


Figure 43 : Les différentes sous unités composant le complexe ESCRT-II. Même représentation qu'en figure 46 & 47 (Schuh & Audhya. 2014).

biogénèse des VILs, plusieurs modèles ont été proposés. Dans les trois principaux modèles, les filaments adoptent des structures en dôme ou en spirale, plus ou moins dynamiques, responsables de la formation du cou et/ou de la scission du bourgeon constituant la VIL naissante (**Figure 44**).

Par ailleurs, l'association des protéines Vps4 A ou B et LIP5 (respectivement Vps4 et Vta1 chez la levure) peut être considérée comme le cinquième complexe ESCRT-IV, avec une fonction de désassemblage du complexe ESCRT-III assurant le recyclage de ses sous unités (Schuh and Audhya, 2014).

Enfin, bien que tous les mécanismes de la voie ESCRT ne soient pas clairement établis, il est assez bien admis que les complexes ESCRT-0,-I et II interviennent en amont pour amorcer une séquence de recrutement de partenaires qui aboutit à la polymérisation du complexe ESCRT-III agissant spécifiquement sur l'architecture membranaire.

iii. Implication de la voie ESCRT dans la biogénèse des exosomes

Etant donné que les exosomes sont formés dans les CMVs et que les complexes ESCRT composent la principale machinerie de biogénèse des CMVs, le concept d'une implication de la machinerie ESCRT dans la biogénèse des exosomes a naturellement émergé (Hurley, 2015).

Au début des années 2000, l'analyse protéomique d'exosomes issus de cellules dendritiques a révélé la présence des protéines Tsg101 et ALIX, constituant ainsi les premiers indices de l'intervention du système ESCRT dans la formation des exosomes (Théry et al., 2001). Il a ensuite été décrit que dans des réticulocytes le TfR interagissait avec ALIX avant d'être adressé vers les exosomes (Géminard et al., 2004).

Plus récemment, les travaux de M.F. Baietti et collaborateurs ont mis en évidence le rôle de la machinerie ESCRT dans l'adressage exosomal des cargos de syndécanes dans des cellules tumorales (Baietti et al., 2012). Les syndécanes sont des protéines transmembranaires remplissant une fonction de co-récepteurs pour des molécules d'adhésion et autres facteurs de croissance à la surface des cellules. La première étape de leur adressage exosomal implique le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine soluble nommée synténine via une interaction avec les domaines cytosolique des syndécanes (Grootjans, 2000). Les auteurs de cette étude (Baietti et al., 2012) ont alors

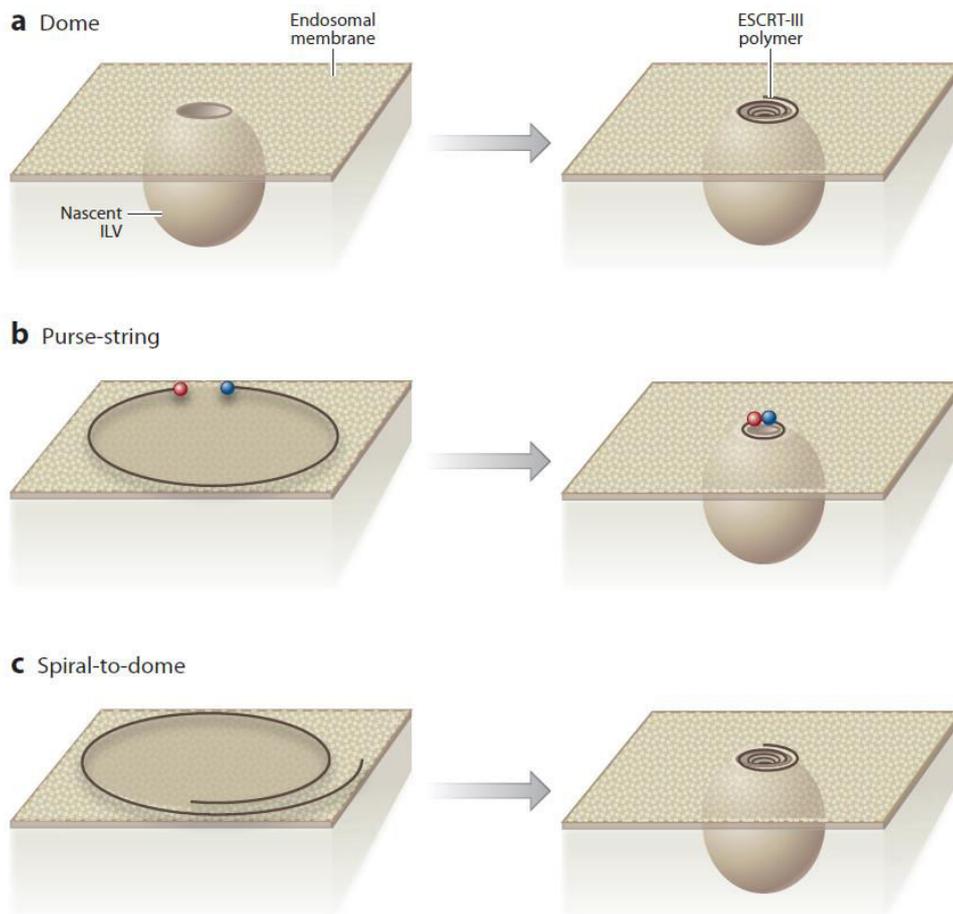


Figure 44 : Modèles décrivant le rôle d'ESCRT-III dans la biogénèse des CMVs. (a) Le modèle « Dome » propose une scission membranaire induite par développement d'une structure en dôme (orienté vers l'intérieur de l'endosome) à partir des filaments d'ESCRT-III à l'intérieur du cou de la vésicule. L'attachement de la membrane au dôme ESCRT-III rétrécit le diamètre du cou membranaire au niveau du sommet jusqu'à ce que la membrane de la vésicule se sépare de celle de l'endosome. (b) Dans le modèle « Purse-string » un unique filament d'ESCRT-III aux extrémités assymétriques délimite dans un premier temps le domaine membranaire de la future vésicule. Dans un second temps, Vps4 raccourci la longueur du filament conduisant au resserrement d'un cou membranaire formant une VIL. (c) Dans le troisième modèle « Spiral-to-dome », une spirale formée initialement par un filament d'ESCRT-III se resserre jusqu'à former un dôme facilitant la scission membranaire comme dans le premier modèle (d'après Hanson & Cashikar. 2012).

montré que la synténine interagissait ensuite avec la protéine ALIX, elle-même liée au complexe effecteur ESCRT-III pour que l'ensemble du cargo se retrouve dans la future vésicule (**Figure 45**). De manière cohérente, les knockdowns de CHMP4 et Vsp4, deux effecteurs d'ESCRT-III intervenant en aval du recrutement d'ALIX, sont tous deux responsables d'un blocage de la biogénèse d'exosomes exprimant des syndécanes.

Dans la même étude, il a été montré que le knockdown de CD63 ne perturbe pas la biogénèse des exosomes alors que les knockdowns ESCRT provoquent une diminution de la quantité de CD63 sécrétée. Ce résultat suggère que CD63, tétraspanine décrite comme un des principaux marqueurs exosomaux, ne serait pas un élément clef de cette voie de libération exosomale mais aurait davantage un rôle pour accompagner la syndécane dans la voie (Hurley, 2015).

Une autre étude a examiné individuellement le rôle de plusieurs composants de la machinerie ESCRT en employant une stratégie d'ARNs interférants dans des cellules HeLa (Colombo et al., 2013). Parmi leurs observations, les auteurs ont notamment montré que la diminution de l'expression des protéines Hrs, STAM1 et Tsg101 réduisait la sécrétion exosomale.

Dans une littérature relativement récente, de nombreux exemples supplémentaires décrits dans divers types cellulaires illustrent que la voie ESCRT tient un rôle ubiquitaire et fondamental dans le processus de biogénèse des exosomes (Hurley, 2015). Toutefois, la comparaison des résultats obtenus entre ces études employant différents types cellulaires met en lumière certaines divergences concernant le rôle respectif des éléments de la machinerie ESCRT (Colombo et al., 2014).

iv. Voies ESCRT-indépendantes dans la biogénèse des exosomes

L'importance de la voie ESCRT dans la biogénèse des exosomes a été remise en question par des études révélant des voies ESCRT-indépendantes.

En exprimant un allèle dominant négatif de la sous unité Vps4, invalidant sa fonction d'ATPase dans des lignées oligodendrogiales, des auteurs ont décrit que la libération d'exosomes n'était pas affectée par cette perturbation (Trajkovic et al., 2008). En revanche, ils montrèrent dans la même étude que l'inhibition de la sphingomyelinase neutre (une hydrolase clivant les sphingomyélines en phosphocholine et céramides) réduisait cette

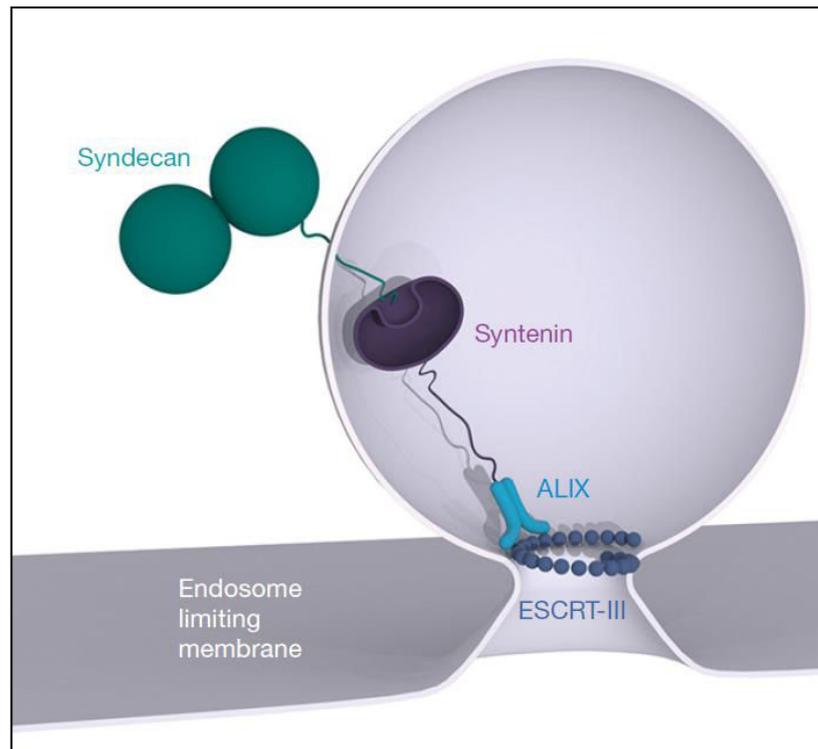


Figure 45 : Adressage exosomal de la syndécane par la machinerie ESCRT. Le cargo de syndécane interagit avec la synténine. Puis la synténine se lie à ALIX qui interagit elle-même avec ESCRT-III (d'après Hurley 2015).

libération. Aux vues de ces résultats suggérant une voie ESCRT-indépendante où la sphingomyelinase serait déterminante, les auteurs proposèrent un modèle basé sur l'action des céramides, lesquels sont retrouvés en abondance dans les exosomes. L'enrichissement de molécules de céramide dans des microdomaines favoriserait le bourgeonnement de la membrane. Mais bien que le modèle demeure attractif vis-à-vis de la biophysique des bourgeons membranaires, il ne rend pas compte de l'adressage sélectif de cargos dans les VILs (Hurley and Odorizzi, 2012; Trajkovic et al., 2008).

D'autres études menées par le groupe de G.Raposo sur des mélanocytes indiquent que les cellules de mammifères peuvent former des CMVs indépendamment du système ESCRT (Theos et al., 2006) ou du céramide (van Niel et al., 2011). Dans une de ces études, il a été montré que CD63 est crucial pour l'adressage exosomal du domaine luminal soluble de la protéine PMEL (premelanosome protein), alors que la voie ESCRT prend en charge son domaine transmembranaire vers les voies de dégradation (van Niel et al., 2011). Par ailleurs, dans des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney), la surexpression des tétraspanines CD9 et CD82 stimule la libération exosomale de β -caténines (Chairoungdua et al., 2010).

Ces quelques exemples montrent qu'il existe d'autres voies en parallèle de la voie ESCRT qui interviennent dans la formation de CMVs (**Figure 46**).

v. *Sécrétion exosomale*

Pour de nombreux types cellulaires, une sécrétion spontanée d'exosomes a pu être observée, suggérant un processus constitutif. Ce processus serait régulé par plusieurs facteurs comme les cytokines, les contacts intercellulaires (Arita et al., 2008) ou le calcium (Krämer-Albers et al., 2007; Montecalvo et al., 2012; Valadi et al., 2007). Par ailleurs, la sécrétion d'exosomes est généralement mesurée sur des cellules en culture considérées dans un état basal et stable. Pour autant, les conditions de culture cellulaire comme les changements de milieu sont susceptibles de déclencher ou modifier la sécrétion exosomale (Colombo et al., 2014).

La libération exosomale comprend les étapes de mobilisation des CMVs à la périphérie cellulaire, leur amarrage et enfin leur fusion avec la membrane plasmique. Et bien que toutes ces étapes ne soient pas entièrement caractérisées, des données révèlent l'importance de différents effecteurs.

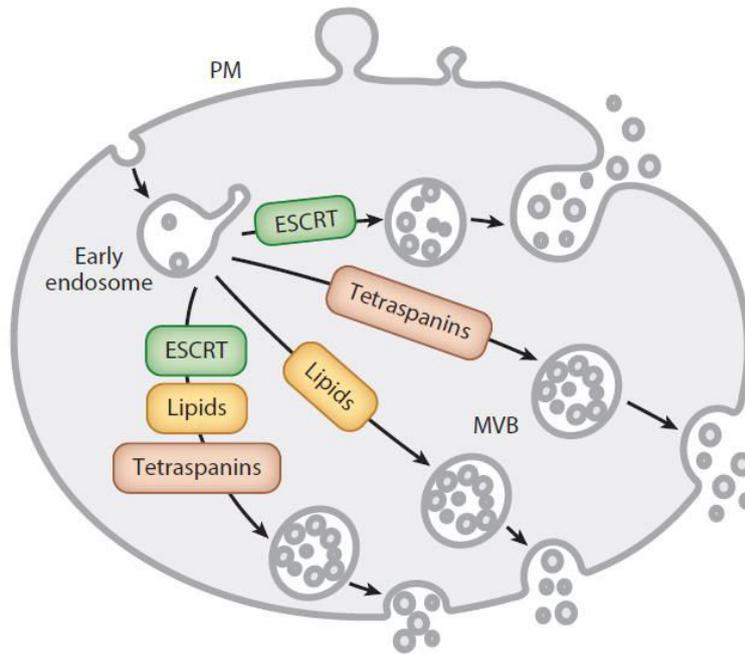


Figure 46 : *Machineries moléculaires impliqués dans la biogénèse des exosomes et VEs. Les composants de la machinerie ESCRT, des lipides, et certaines tétraspanines participent à la biogénèse des CMVs. Le niveau d'interdépendance de ces différents éléments étant mal connu, certains auteurs ont proposé des voies exclusives et indépendantes alors qu'un phénomène de coopération reste tout à fait plausible (d'après Colombo et al. 2014).*

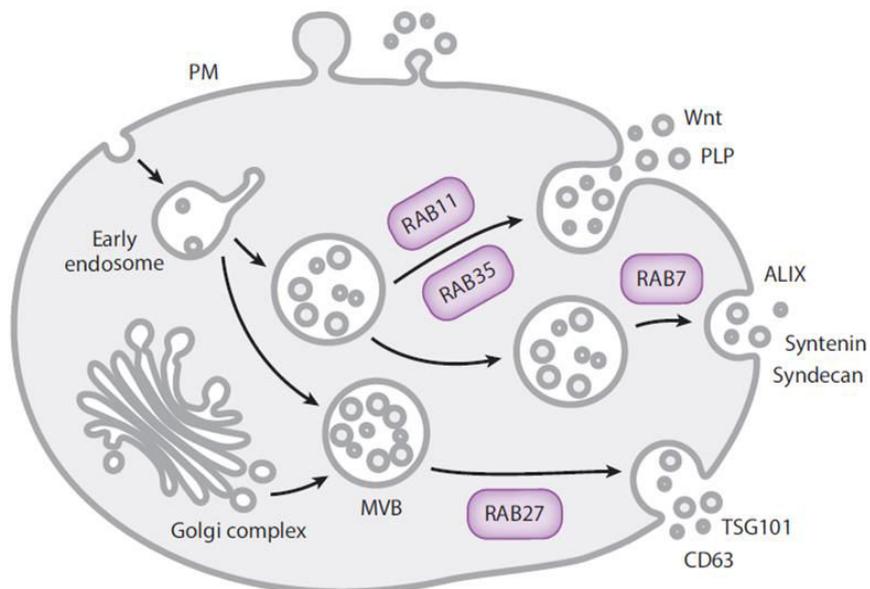


Figure 47 : *Les protéines Rabs associées à différentes voies de sécrétion exosomales (d'après Colombo et al. 2014).*

Les protéines de la famille des Rab sont connues pour être des éléments régulateurs importants du trafic intracellulaire des vésicules. En effet, ces protéines de type GTPases sont impliquées à la fois dans le bourgeonnement, la mobilité et l'amarrage vésiculaire. De plus, il existe une association préférentielle de chacune des Rabs avec les différents compartiments intra-cellulaires. Des études de criblage ont été réalisées en ciblant les gènes de ces protéines Rab au moyen de mutants-négatifs afin de déterminer leur incidence sur la sécrétion des vésicules extracellulaires (**Figure 47**). Parmi les différentes Rab-GTPase identifiées, Rab 11 et Rab 35 qui ont été plusieurs fois décrites pour leur implication dans la sécrétion de VEs (Frühbeis et al., 2013; Savina et al., 2002) sont trouvées associés aux endosomes précoces (Stenmark, 2009). Par conséquent, leur niveau d'implication dans la libération de vésicules de type exosome, strictement issues des CMVs, peut être questionnée (Colombo et al., 2014). D'autre part, il a été montré que les protéines Rab27A/B, qui sont liées aux endosomes tardifs et sécrétoires (Stenmark, 2009), permettent l'amarrage des CMVs à la membrane plasmique. Des expériences de sous-régulation de l'expression des isoformes Rab27A/B, opérées dans des cellules HeLa exprimant le CMH-II, induisent effectivement une diminution de sécrétion des vésicules portant des marqueurs exosomaux tels que CD63, CD81 et le CMH-II (Ostrowski et al., 2010). Rab27A est d'ailleurs considéré comme un régulateur de la fusion des CMVs avec la membrane plasmique (Hurley and Odorizzi, 2012). De plus, la protéine Rab7, qui est elle aussi associée aux endosomes tardifs, se trouve impliquée dans la sécrétion d'exosomes contenant la synténine et ALIX, dans la lignée tumorale MCF-7 (Baietti et al., 2012). En revanche, sa déplétion n'affecte en rien la sécrétion exosomale dans les cellules HeLa II (Ostrowski et al., 2010). Cette donnée indique que différents types de CMVs peuvent être employés différemment d'un type cellulaire à l'autre pour la sécrétion exosomale.

De par leur capacité à conduire les processus de fusion vésiculaire, les protéines SNAREs sont suspectées de jouer un rôle dans la dernière étape de fusion nécessaire à la libération des VEs. Toutefois, le peu de données publiées à ce jour ne permet pas de définir un mécanisme de fusion caractéristique mobilisant des SNAREs bien identifiées, et ce d'autant que les observations peuvent diverger d'un système à l'autre. Par exemple, la VAMP7 est directement impliquée dans la libération de VEs pour la lignée cellulaire K562 issue de leucémie humaine (Fader et al., 2009) mais pas dans des cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Proux-Gillardeaux et al., 2007). On peut alors facilement imaginer que

les isoformes de SNAREs intervenant dans la fusion des CMVs peuvent varier selon le type cellulaire ou que des protéines SNAREs différentes seraient mobilisées dans des voies de sécrétion distinctes au sein de la même cellule (Colombo et al., 2014). L'existence au sein d'une même cellule de voies parallèles dans la biogénèse des exosomes est suggérée par l'identification de sous-populations distinctes sécrétées par le même type cellulaire. Par exemple, dans les cellules épithéliales intestinales, la caractérisation des exosomes provenant des régions apicales et baso-latérales, a révélé des variations de composition notables discriminant deux types de vésicules sécrétées (van Niel, 2006).

f. Fonctions biologiques

i. *Rôles physiologiques et physiopathologiques*

L'élimination par la cellule de molécules obsolètes a été la première fonction physiologique attribuée aux exosomes, au début des années 80. Les premières visualisations d'exosomes montrèrent que les TfRs des réticulocytes étaient adressés dans des VILs avant d'être évacués de la cellule (Harding et al., 1983). Ce processus participe de manière indirecte à l'étape de différenciation des réticulocytes en érythrocytes, laquelle décrit une diminution progressive de l'expression des TfRs.

Plus tard, une fonction de vésicules présentatrices d'antigènes a été identifiée *in vitro* pour des exosomes issus de lignées de lymphocytes B humains et murins et capables d'induire l'activation de lymphocytes T par présentation de molécules CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II) (Raposo et al., 1996). Le groupe de L. Zitvogel, S. Amigorena et G. Raposo montra ensuite que les exosomes sécrétées par des cellules dendritiques, cellules connues pour initier les réponses immunes adaptatives, arboraient des molécules de CMH-I pour induire des réponses immunes anti-tumorales observées *in vivo* (Zitvogel et al., 1998). Après que ces résultats aient dévoilé le potentiel de communication intercellulaire des exosomes au sein du système immunitaire, de nombreuses études se sont ensuite focalisées sur le rôle des exosomes dans les mécanismes de la réponse immunitaire. Parmi l'ensemble des données recueillies, certaines ont convergé vers un schéma d'action des exosomes issues de cellules présentatrices d'antigènes et impliqués dans l'activation des lymphocytes T et lymphocytes NK (Natural Killer) (**Figure 48**). Par ailleurs, il a été reporté que

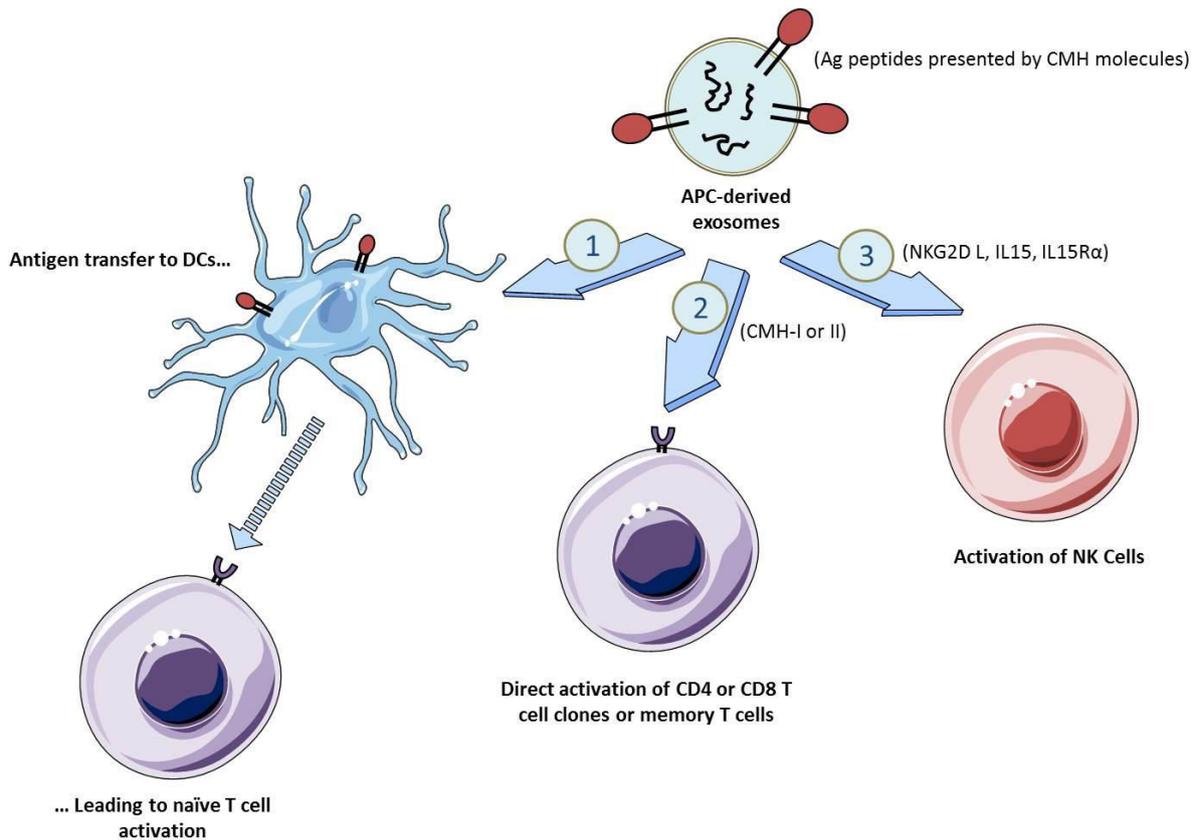


Figure 48 : Les différentes voies de présentation d'antigènes par les exosomes. Les exosomes sécrétés par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) présentent via les molécules CMH des antigènes (Ag) à leur surface. (1) Ces exosomes peuvent dans un premier temps transférer les antigènes aux cellules dendritiques (DCs) qui activeront dans un deuxième temps les lymphocytes T naïfs. (2) L'activation des lymphocytes peut être induite par présentation directe de l'antigène par l'exosome. (3) Enfin, les exosomes peuvent exprimer des ligands responsables de l'activation des cellules Natural Killer (NK) (d'après Bobrie et al. 2011).

l'état des cellules sécrétrices comme la maturation des cellules dendritiques, était déterminant pour le processus d'activation des lymphocytes T. Ainsi, les exosomes sécrétés par des cellules dendritiques matures induisent des réponses immunes *in vivo* conduites par les lymphocytes T activés ou des anticorps; alors que ceux provenant de cellules dendritiques immatures ne peuvent initier de telles réponses qu'en présence d'adjuvants ou de cellules dendritiques matures (Andre et al., 2004). En effet, lorsque les exosomes de cellules dendritiques immatures sont injectés seuls, ils ont tendance à induire des réponses immunes de tolérance (Bobrie et al., 2011). Les mécanismes par lesquels les exosomes peuvent moduler les effecteurs du système immunitaire s'avèrent encore plus complexes dans le cas des exosomes sécrétées par les cellules tumorales (Bobrie et al., 2011). Au sein du système immunitaire le rôle des exosomes est à la fois influencé par leur origine cellulaire et le contexte immunologique. Selon les situations, ces vésicules peuvent alors initier et/ou participer à des réponses immunes anti-tumorales, ou au contraire favoriser le développement de tumeurs. Ils sont aussi impliqués dans des réactions immunes de tolérance justifiant dans certains cas le terme de « tolérosome ». Enfin ils participent à la surveillance immune en représentant des extensions fonctionnelles pour les cellules présentatrices d'antigènes.

A l'heure actuelle on considère que toutes les cellules secrèterait des exosomes qui assureraient un rôle dans la communication inter-cellulaires par transfert de protéines et d'acides nucléiques.

Au niveau central, de nombreuses études ont exploré le rôle d'exosomes provenant de neurones, d'astrocytes, d'oligodendrocytes, de cellules microgliales ou même de cellules souches neuronales. Par exemple, il été décrit que des exosomes provenant de neurones corticaux expriment les sous unité GluR2/3 du récepteur AMPA et que leur sécrétion est augmentée par la dépolarisation neuronale (Fauré et al., 2006; Lachenal et al., 2011). Les données recueillies par ces auteurs suggèrent un rôle des exosomes dans la modulation de l'activité synaptique, favorisant les phénomènes de dépression synaptique par la délivrance de sous unités GluR2 au niveau post-synaptique.

Au niveau périphérique les exosomes jouent un rôle protecteur dans la régénération neuronale. En effet, les cellules de Schwann qui enveloppent les fibres nerveuse en dégénérescence ou endommagées libèrent des exosomes destinés à la translocation de polyribosomes dans le compartiment axonal (Court et al., 2011). Ainsi les exosomes sont

utilisés par les cellules de soutien comme véhicules transportant les ribosomes et ARNms nécessaires à la synthèse locale de nouvelles protéines requises pour la régénération. Enfin, les exosomes sont impliqués dans plusieurs processus pathologiques neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington ou les mécanismes de la sénescence (Kalani et al., 2014; van Niel, 2016).

Au cours d'études développementales, il a été montré que plusieurs sortes de VEs, dont certaines présentent le diamètre caractéristique des exosomes, sont libérées dans le fluide ventriculaire du tube neural dès les premiers stades de neurogénèse (Marzesco, 2005). A l'image des microvésicules de cellules souches capables de reprogrammer des progéniteurs hématopoïétiques (Ratajczak et al., 2006), il est probable que les exosomes puissent transférer du matériel génétique déterminant pour le devenir des cellules au cours du développement, comme des ARNms codant pour des facteurs de transcriptions pluripotents ou de différenciations .

Au niveau des cellules épithéliales, les exosomes provenant des régions apicales et baso-latérales, présentent des différences biochimiques et morphologiques associées à des différences fonctionnelles. Par exemple, les vésicules sécrétées par le versant apical des cellules épithéliales intestinales participent au transfert de matériel et joueraient un rôle dans la régulation de la perméabilité de l'épithélium intestinal (Liu, 2005). D'autre part, les exosomes libérés par le versant baso-latéral des cellules intestinales ont une fonction de présentation d'antigènes auprès des effecteurs du système immunitaire localisé à proximité dans la muqueuse intestinale accessible (Van Niel et al., 2001; van Niel, 2006).

Dans le fluide prostatique, parmi les VEs sécrétées par les cellules épithéliales de la prostate, aussi appelées « prostatasomes », des vésicules de type exosomal interviennent à plusieurs niveaux pour assurer la fonction des spermatozoïdes. Plusieurs études se sont ainsi intéressées à leur multiples rôles physiologiques dans la capacitation des spermatozoïdes, la réaction acrosomale ou encore leurs interactions avec les cellules immunitaires des voies génitales féminines (Aalberts et al., 2013). Des expériences *in vitro* ont d'ailleurs démontré que ces vésicules possédaient des capacités immunosuppressives affectant les leucocytes, modulant l'activité du système du complément ou déployant des mécanismes antiviraux et antibactériens. Dans le cancer de la prostate, suite à la perte de polarité des cellules épithéliales malignes hyperplasiques, les prostatasomes se retrouvent libérés dans des compartiments tissulaires interstitiels ou dans le sang, où leurs propriétés

immunomodulatrices pourraient favoriser le développement d'une tumeur métastatique (Ronquist and Nilsson, 2004).

Concernant l'implication des exosomes dans le développement des cancers, de récentes données convergent vers l'idée que les exosomes issus de cellules cancéreuses favorisent l'invasion cancéreuse et le processus de métastase en créant des microenvironnements fertiles pour la croissance tumorale, et ce, aussi bien au voisinage de lésions néoplasiques qu'à distance dans le cas des métastases. Les mécanismes par lesquels ces exosomes conduisent à de tels effets passent par la révélation du potentiel tumorigène des cellules réceptrices avec d'une part l'apport d'éléments oncogènes et d'autre part l'atténuation des réponses immunes de l'organisme (Soung et al., 2016).

ii. Interaction des exosomes avec des cellules cibles

Le rôle des exosomes dans la communication inter cellulaire dépendent de leur capacité à interagir avec des cellules cibles bien définies. La spécificité de liaison dépend à la fois de molécules présentes à la surface de l'exosome et des récepteurs à la surface de la cellule cible. Il a été montré que des molécules d'adhésion comme les intégrines régiraient la sélectivité de ciblage de l'exosome (Rana et al., 2012). Cette spécificité d'adressage est illustrée par de nombreuses études, parmi lesquelles on peut citer la liaison spécifique d'exosomes issus de lymphocytes B sur les cellules dendritiques des follicules lymphoïdes (Denzer et al., 2000). Toutefois, la connaissance des phénomènes d'adressage spécifiques des exosomes vers les cellules cibles n'en est qu'à ses débuts et revêt un fort potentiel pour des applications médicales.

En outre, pour que les exosomes puissent agir à distance, ces derniers doivent être dotés de certaines capacités de résistance pour supporter les contraintes environnementales dans lesquelles ils évoluent. Ainsi la composition lipidique particulière des exosomes rappelant celle des radeaux lipidiques tout comme la présence de protéines telles que CD55 ou CD59, favorisant une protection contre le système du complément, ont été proposées comme gages de robustesse (van Niel, 2006).

3. Méthodes d'adressage de protéines dans les exosomes

a. Expression exosomale de protéines recombinantes

Plusieurs travaux ont montré qu'il était possible de modifier la composition protéique des exosomes pour des applications vaccinales ou de vectorisation de drogues. Le principe de ces stratégies consiste à faire exprimer dans des cellules en culture une chimère composée d'un domaine protéique soluble couplée à une protéine des exosomes. Le groupe de Lepeck (Delcare 2005) a ainsi décrit pour la première fois une méthode permettant d'exprimer des protéines solubles comme Nef (pour Negative Regulatory factor, protéine du virus HIV), IL-2 (InterLeukine de type 2) et GM-CSF (pour Granulocyte/Monocyte Colony Stimulating Factor) à la surface des exosomes après transfection d'une chimère comprenant la protéine d'intérêt couplée au domaine C1C2 de la lactadhérine qui est une protéine exosomale. Les chimères C1C2 solubles peuvent lier des exosomes « naifs » provenant de cellules non transfectées (Delcayre et al., 2005). Cette propriété remarquable de liaison des domaines C1 C2 de la lactadhérine à la surface exosomale serait due à des interactions spécifiques avec certains lipides. Par comparaison avec une forme soluble, la présentation d'antigènes tumoraux dans des exosomes par cette méthode, augmente très significativement la réaction immunitaire (Hartman et al., 2011; Zeelenberg et al., 2008).

D'autres travaux montrent que l'on peut adresser des peptides à la surface des exosomes. Ainsi l'ubiquitine associée à la machinerie ESCRT a aussi été utilisée avec succès pour augmenter la réponse immunitaire après vectorisation des peptides d'intérêt dans des exosomes (Cheng and Schorey, 2015). D'autre part, N.Yim a montré que l'on pouvait adresser une protéine soluble à l'intérieur des exosomes après couplage réversible avec la tétraspanine CD9 (Yim, 2016). Enfin un peptide du virus de la rage a été couplé à la protéine Lamb2b exprimées dans les exosomes à des fins de vectorisation du contenu de ces exosomes (Alvarez-Erviti et al., 2011).

Concernant les protéines membranaires, il a été observé que la simple transfection de plasmides codant pour ce type de protéines permettait de les retrouver dans différents compartiments cellulaires dont les exosomes (Delcayre et al., 2005; Estelles et al., 2007). Des PMIs complexes telles que le récepteur de la somatostatine de type 2 (SSTR-2) humain ont été exprimées dans des exosomes de cellules de mammifères après transfection virale

(Estelles et al., 2007). On peut alors supposer que dans ce contexte de surexpression imposé à la cellule, cette dernière mobilise les exosomes comme voie d'évacuation des éléments accumulés.

b. La technologie Ciloa

Ciloa est une entreprise française de biotechnologie créée en 2011 par le Dr. Robert Mamoun et basée à Montpellier (**Ciloa.fr**). Cette société exploite une technologie permettant l'adressage de PMIs recombinantes dans les membranes exosomales. Cette technologie, qui repose sur l'utilisation de séquences « peptide pilote », a notamment fait l'objet de brevets (**WO/2009/115561** ; **WO/2011/036416**) déposés en partenariat avec le CNRS et l'université Montpellier II.

i. Prérequis : lien entre exosomes et bourgeonnement viral

Pour certains virus enveloppés tels que le VIH ou Ebola, la formation de l'enveloppe virale mobilise la machinerie cellulaire impliquée dans la biogénèse des CMVs, soit les complexes ESCRT. De ce fait, des similitudes topologiques existent entre le bourgeonnement des particules virales, intervenant soit à la membrane plasmique soit au niveau de l'endosome, et le bourgeonnement de certaines VEs dont les exosomes. Pour emprunter la voie ESCRT, les virus disposent de protéines d'enveloppe ou protéines de la matrice abritant des motifs peptidiques capables de lier des partenaires de la voie ESCRT. Les protéines Gag (Group-specific antigen), qui sont regroupées au sein d'un précurseur polypeptidique du même nom, figurent parmi les protéines les plus importantes pour le bourgeonnement viral (**Figure 49**). En effet, les différents domaines du précurseur Gag sont impliqués dans diverses étapes de la formation des virions et peuvent ainsi conduire ce processus indépendamment des autres protéines virales incorporées (Marsh and Thali, 2003). Par exemple, il a été montré pour le HIV-1 que les dernières étapes de la réplication virale dépendaient essentiellement de Gag et notamment des interactions avec le système ESCRT (**Figure 50**). Il est intéressant de noter que des motifs peptidiques de type Pro(Ser/Thr)AlaPro ou Tyr-x-x-Leu (YxxL) sont retrouvés au sein des protéines exprimées par de nombreux virus enveloppés, et que ceux-ci ont été décrits comme interagissant avec les protéines ESCRT. Ainsi le domaine P6 de la protéine Gag du virus HIV-1 comporte un motif Pro-Thr-Ala-Pro

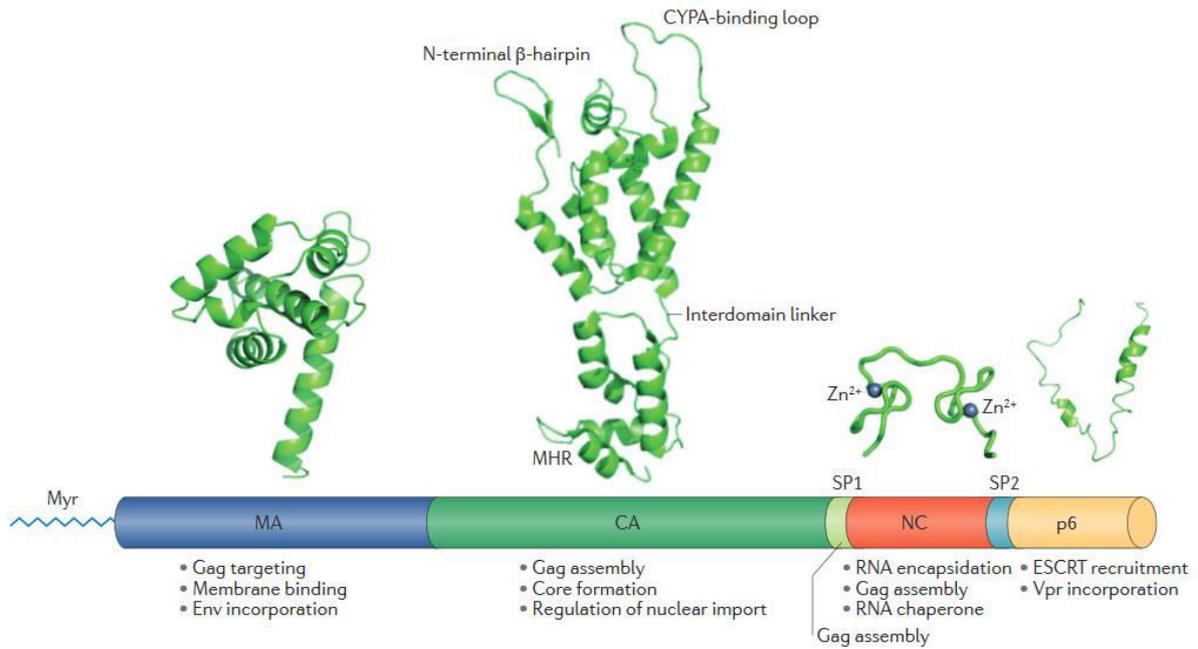


Figure 49 : Structure du précurseur polypeptidique Gag de HIV-1 et domaines fonctionnels. Les principaux domaines de Gag, correspondent à des protéines de la matrice (MA), de la capsid (CA), de la nucléocapsid (NC) ainsi que le domaine p6 (p6). En dessous de chaque domaine sont indiquées les fonctions que remplit la protéine dans la production de nouvelles particules virales. Dans le cas de HIV-1, le domaine p6 est impliqué dans le recrutement de la machinerie ESCRT (d'après Freed. 2015).

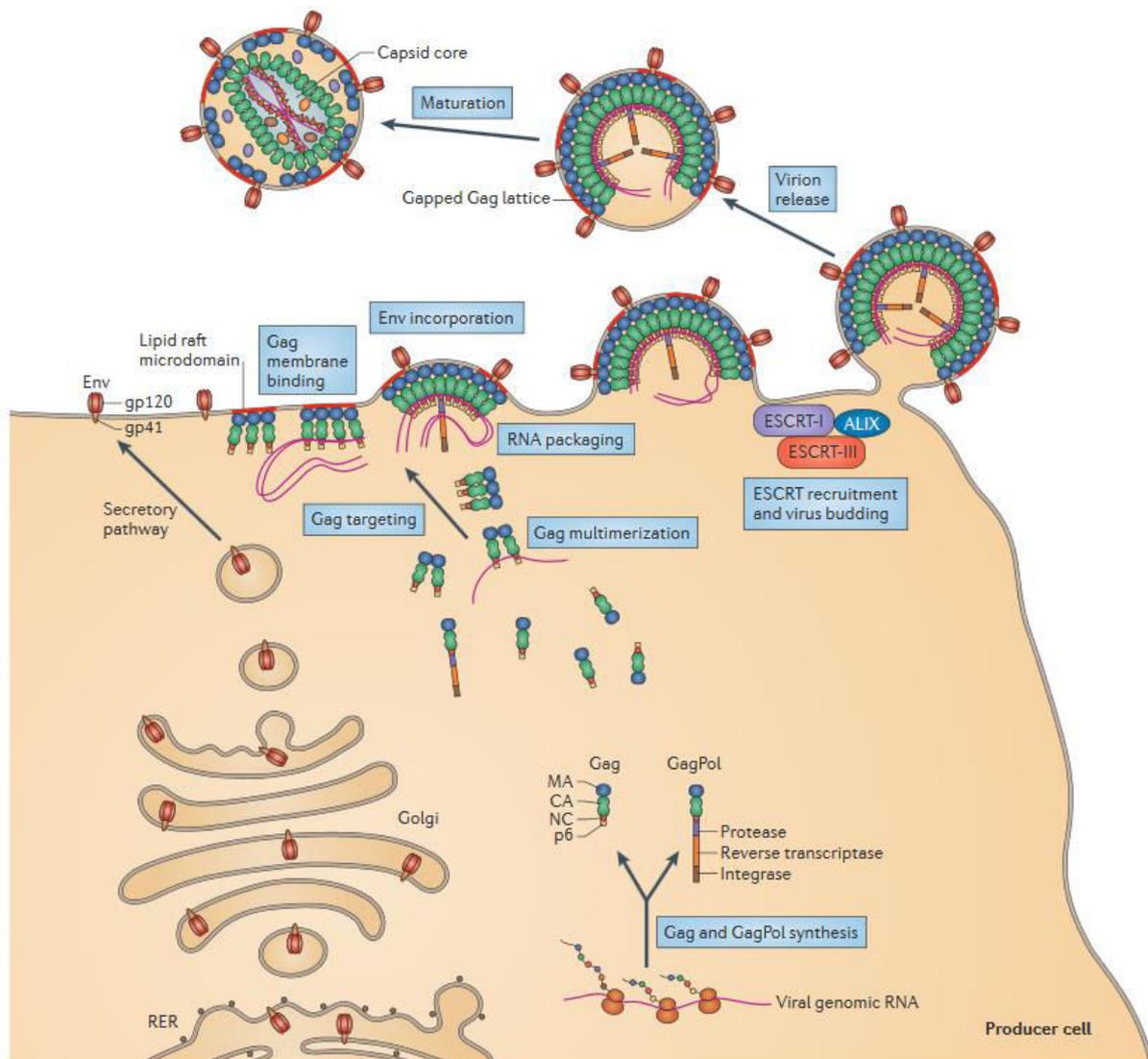


Figure 50 : Schéma représentant les dernières étapes de la réplication de HIV-1. D'un côté (à gauche) les glycoprotéines de l'enveloppe virale (Env) sont transportées via la voie sécrétrice depuis le réticulum endoplasmique granuleux (RER) jusqu'à la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétion. En parallèle (en bas, à droite) le précurseur polypeptidique Gag [comprenant les domaines de la matrice (MA), de la capside (CA) de la nucléocapside (NC) et le domaine p6 (p6)] est synthétisé dans le cytosol à partir de l'ARN viral. Un changement programmé du cadre de lecture est responsable de la synthèse supplémentaire d'un second précurseur polypeptidique, celui de la polymérase Gag (GagPol) [comprenant les domaines MA, CA, NC ainsi qu'un domaine de protéase, de transcriptase inverse et d'intégrase]. Gag recrute par la suite l'ARN viral, forme des oligomères qui sont adressés à la membrane plasmique par une voie encore mal connue. Le polypeptide Gag trouve alors un ancrage dans les radeaux lipidiques via son extrémité N-terminale myristylée et l'interaction directe avec les molécules de phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. Au cours de son assemblage la particule incorpore les protéines Env et recrute le complexe ESCRT-I ainsi que la protéine ALIX. Le bourgeonnement viral s'achève avec l'intervention du complexe ESCRT-III (d'après Freed. 2015).

(PTAP) permettant une liaison à la sous unité Tsg101 du complexe ESCRT-I (Demirov et al., 2002). Ce même motif PTAP est d'ailleurs présent dans la séquence de la protéine Gag du spumavirus humain (ou l'HSRV pour Human SpumaRetroVirus) (Patton et al., 2005) ou dans la protéine VP40 de la matrice du virus Ebola (Licata et al., 2003). Concernant les motifs de type YxxL, le virus de l'anémie infectieuse équine (ou EIAV pour Equine Infectious Anémia virus) expose un tétrapeptide Tyr-Pro-Asp-Leu porté par le domaine P9 de Gag et se liant à la protéine ALIX (Strack et al., 2003). D'autres motifs proches tels que Pro-Pro-x-Tyr_n-Leu sur la protéine Gag du virus de la leucémie bovine (ou BLV pour Bovine Leukemia Virus) interagissent avec des protéines associées à la machinerie ESCRT, comme NEDD4 (Wang et al., 2002).

Divers partenaires de la machinerie ESCRT peuvent ainsi s'associer aux différents motifs qu'exposent les protéines virales sur des domaines dit « tardifs » car impliqués dans les dernières étapes du bourgeonnement viral, représentant autant de voies d'entrée pour emprunter la machinerie. Cela étant, des données montrent que l'échange de ces domaines tardifs entre la protéine Gag de HIV-1 et la protéine Vp40 du virus Ebola ne perturbe pas la production des virions, suggérant une base mécanistique commune pour le processus de bourgeonnement viral (Martin-Serrano et al., 2001). Cette hypothèse est notamment appuyée par le fait que la libération de virions arborant différents motifs peptidiques peut être inhibée dans le cas de dominant négatif Vps4, une protéine importante opérant en aval de la voie ESCRT (Marsh and Thali, 2003).

ii. Origine et intérêt des peptides d'adressage développés par Ciloa

En 2008, le groupe mené par R. Mamoun et M. Vidal a publié des travaux portant sur l'adressage exosomal d'une protéine chimérique (De Gassart et al., 2009). Cette protéine du nom de CDTM-BLV-CD8, correspond à l'assemblage des domaines cytosolique et transmembranaire de la protéine d'enveloppe (Env) du BLV avec l'ectodomaine de la protéine CD8. Alors que la partie CD8 fait office de domaine rapporteur neutre orienté vers le milieu extra cellulaire, le domaine cytosolique de la protéine virale Env a été choisi par les auteurs pour la présence de plusieurs motifs susceptibles d'induire l'adressage exosomal de la construction. En effet, la séquence de ce domaine décèle pas moins trois motifs de type YxxL et deux de type Pro-(Ser/Thr)-Ala-Pro (**Figure 51**) précédemment décrits.

CDTM-BLV-CD8

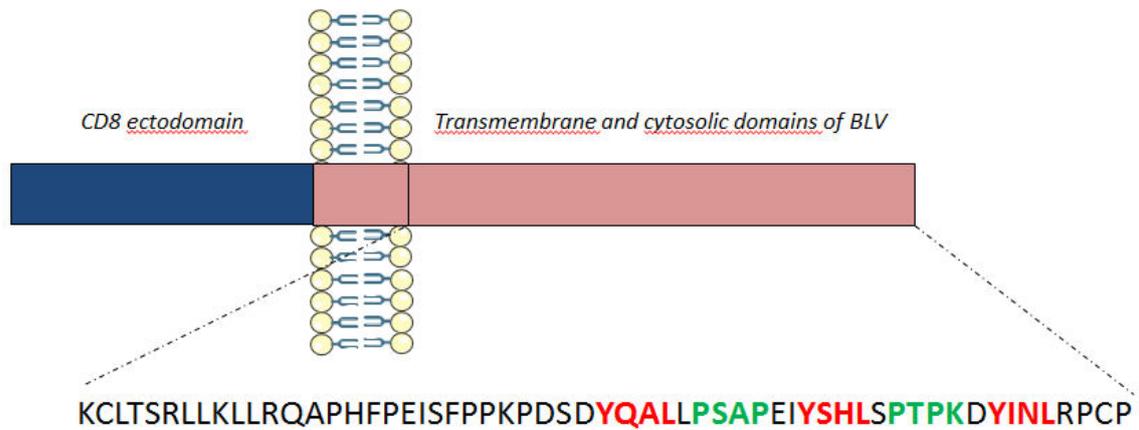


Figure 51 : Représentation schématique de la protéine chimérique CDTM-BLV-CD8. La protéine chimérique est formée de l'ectodomaine de CD8 (partie bleue) et des domaines transmembranaire et cytosolique de la protéine Env du BLV (partie rose). La séquence du domaine cytosolique représentée en dessous comporte 5 motifs putatifs d'interactions avec la machinerie ESCRT, soient trois motifs de type YxxL (rouges) et deux motifs de type P(S/T)AP (verts) (d'après De Gassart et al. 2008).

Les auteurs ont alors montré que la chimère CDTM-BLV-CD8 exprimée dans la lignée cellulaire K562 se retrouve spécifiquement enrichie dans les exosomes par rapport au reste de la cellule. Dans cette étude (De Gassart et al., 2009), les exosomes ont été purifiés par centrifugations différentielle (De Gassart, 2003) et certains marqueurs tels que la protéine hsc70 ou la flotilline 1 ont été détectés dans la fraction de VEs issues des cellules K562. Par ailleurs, ces marqueurs sont particulièrement enrichis dans les fractions ayant une densité comprise entre 1,13 et 1,19 g/ml, confortant ainsi l'identité exosomale en accord avec d'autres études (Raposo et al., 1996; De Gassart, 2003; Théry et al., 2006).

Les protéines chimériques sont très faiblement détectées à la membrane plasmique mais bien davantage au niveau péri nucléaire. En effet, ils ont pu observer une nette colocalisation de la chimère CDTM-BLV-CD8 avec des marqueurs trans-Golgiens ou encore endosomaux tel que TGN46 du réseau trans-Golgien et CD63 pour les endosomes tardifs. Aussi, à l'aide d'expériences complémentaires employant des inhibiteurs spécifiques de certaines voies endosomales, les auteurs ont proposé que les exosomes enrichis en protéines chimériques se forment dans des endosomes en relation avec le réseau trans-Golgien.

De plus, bien que cela ne soit pas strictement montré dans cette étude, les données recueillies suggèrent l'intervention de la machinerie ESCRT dans l'adressage exosomal de la chimère. A la suite de ces travaux, la séquence du domaine cytosolique de la protéine Env du BLV a constitué une base pour le développement d'un peptide pilote pour vectoriser des protéines membranaires dans des exosomes.

RESULTATS

I. Article 1 : Biosenseurs d'affinité utilisant des protéines membranaires natives exprimées à la surface d'exosomes : application aux récepteurs de la BoNT/B

1. Introduction

L'utilisation de biosenseurs pour déterminer les paramètres cinétiques de liaison ligands/récepteurs sont essentiels pour le développement et la validation de nouveaux médicaments (Pan et al., 2013). Mais bien que les protéines membranaires soient des cibles de premier ordre pour les applications thérapeutiques, le développement de tests *in vitro* reposant sur des biosenseurs pour examiner des interactions de ligands avec des récepteurs correctement repliés au sein de bicouches lipidiques représente encore à ce jour un véritable défi technique.

Les exosomes sont une catégorie de vésicules extracellulaires naturellement sécrétées par de nombreux types cellulaires. De par leur biogénèse, les exosomes se distinguent des vésicules intracellulaires en exprimant à leur surface des protéines dont la topologie membranaire est identique à celle retrouvée au niveau de la membrane plasmique.

L'objectif premier de cette étude a été de développer une approche générale visant à exprimer des protéines membranaires recombinantes dans des exosomes. Pour cela, nous avons utilisé une séquence d'adressage spécifique breveté afin de diriger l'expression de plusieurs récepteurs membranaires dans les membranes exosomales, dont les récepteurs de la BoNT/B sur lequel une seconde partie de l'étude s'est focalisée.

Les BoNT/A, B et E produites par les bactéries *Clostridium botulinum* sont les principaux sérotypes de BoNTs impliqués dans le botulisme humain. Le botulisme se traduit par une paralysie fonctionnelle des motoneurones périphériques. Le mode d'action des BoNTs peut se décomposer en trois étapes : une liaison très spécifique aux terminaisons présynaptiques, suivie d'une internalisation dans le cytosol permettant à la toxine de manifester une activité enzymatique de clivage, dirigée contre des protéines essentielles pour la neurotransmission, soit les protéines du complexe SNARE. Et s'il est vrai que les

BoNTs figurent parmi les substances biologiques les plus toxiques, leur capacité à bloquer de manière réversible la neurotransmission constitue aussi une base de traitement pour certaines pathologies. Actuellement, leur potentiel thérapeutique s'élargit avec la découverte de différences subtiles entre les sous-types de BoNTs, accompagnant le développement de nouvelles BoNTs recombinantes.

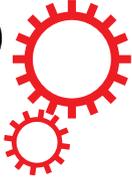
Par ailleurs, le contrôle de qualité des lots pharmaceutiques de BoNTs s'appuie, encore de nos jours, sur une méthode standard employant un test d'intoxication chez la souris qui se trouve être controversé sur le plan éthique. Dans ce contexte, des alternatives de tests *in vitro* capables de quantifier la liaison, la translocation ou l'activité enzymatique des BoNTs se doivent d'être rapidement proposées. Des tests très sensibles pour mesurer l'activité enzymatique des BoNT/A, B et E ont été développés. Cependant, des méthodes d'analyses simples, permettant de mesurer les paramètres de liaison des BoNTs aux récepteurs neuronaux font toujours défaut.

Cette première étude présente de nouveaux tests *in vitro* combinant l'usage d'un biosenseur avec des récepteurs membranaires complexes adressés dans des exosomes. Dans un premier temps, nous avons mesuré la liaison de ligands spécifiques sur plusieurs récepteurs exprimés dans la membrane des exosomes en observant notamment la liaison effective de ligands sensibles à la conformation ou état d'oligomérisation de leurs récepteurs. Puis, nous avons déterminé l'affinité et les paramètres cinétiques de la liaison de la BoNT/B sur le complexe SYT2/GT1b qui est décrit comme le co-récepteur de forte affinité pour cette toxine.

2. Publication

[Article publié dans la revue Scientifics Reports]

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Affinity biosensors using recombinant native membrane proteins displayed on exosomes: application to botulinum neurotoxin B receptor

Richard Desplantes^{1,2}, Christian Lévêque^{1,2}, Benjamin Muller³, Manuela Lotierzo³, Géraldine Ferracci^{2,4}, Michel Popoff⁵, Michael Seagar^{1,2}, Robert Mamoun³ & Oussama El Far^{1,2} 

The development of simple molecular assays with membrane protein receptors in a native conformation still represents a challenging task. Exosomes are extracellular vesicles which, due to their stability and small size, are suited for analysis in various assay formats. Here, we describe a novel approach to sort recombinant fully native and functional membrane proteins to exosomes using a targeting peptide. Specific binding of high affinity ligands to the potassium channel Kv1.2, the G-protein coupled receptor CXCR4, and the botulinum neurotoxin type B (BoNT/B) receptor, indicated their correct assembly and outside out orientation in exosomes. We then developed, using a label-free optical biosensor, a new method to determine the kinetic constants of BoNT/B holotoxin binding to its receptor synaptotagmin2/GT1b ganglioside ($k_{on} = 2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{off} = 1.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), yielding an affinity constant ($K_D = 0.6 \text{ nM}$) similar to values determined from native tissue. In addition, the recombinant binding domain of BoNT/B, a potential vector for neuronal delivery, bound quasi-irreversibly to synaptotagmin 2/GT1b exosomes. Engineered exosomes provide thus a novel means to study membrane proteins for biotechnology and clinical applications.

Determination of the binding kinetics of analytes is potentially extremely useful for drug development and assay validation. In principle, purified endogenous or recombinant membrane proteins can be integrated into a lipid environment, such as proteoliposomes, supported lipid bilayers or nanodiscs. However, this approach is not ideal, due to the fact that membrane proteins are difficult to produce, prone to denaturation and do not always retain their functional integrity in artificial lipid bilayers^{1,2}.

Exosomes are extracellular vesicles, produced by many cell types and can be detected or purified using antibodies^{3,4}. Furthermore, the ability of exosomes to carry molecules from native or engineered parental cells and fuse with recipient cells to deliver their cargo, confers considerable biomedical potential^{5,6}. Unlike intracellular vesicles, exosomes display homogeneous topology in which plasma membrane proteins have the same outside-out orientation as at the surface of intact cells. Moreover, exosomes can potentially provide the means of expressing recombinant proteins in small membrane vesicles that can be used as vaccine strategies^{7,8}.

Our principal aim was to develop a general approach to address recombinant membrane proteins to exosomes, using a specific targeting sequence to direct exosomal sorting of a set of membrane drug targets, with a particular focus on the botulinum neurotoxin/B (BoNT/B) receptor. BoNT serotypes A, B and E (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E), produced by the bacteria *Clostridium botulinum* are the main cause of human botulism and are produced as a complex of holotoxin (MW 150 000 Da) and several nontoxic proteins. Although BoNTs are among the most neurotoxic substances known, their ability to reversibly block cholinergic nerves has provided the basis

¹INSERM, UMR_S 1072, 13015, Marseille, France. ²Aix-Marseille Université, 13015, Marseille, France. ³Cilao, cc90 - Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, 34095, Montpellier Cedex 5, France. ⁴CNRS, UMR 7286, Plate-Forme de Recherche en Neurosciences PFRN, 13015, Marseille, France. ⁵CNR Anaérobies et botulisme, Unité Bactéries anaérobies et toxines. Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724, Paris, Cedex 15, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.E. (email: oussama.el-far@inserm.fr)

for treatment of human diseases⁹. Therapeutic potential is currently being extended by the discovery of subtle differences in BoNT subtypes and the development of engineered BoNTs¹⁰.

At the molecular level, BoNTs are di-chain proteins composed of a heavy chain (Hc, 100 kDa) and a light chain (Lc, 50 kDa), linked by a disulfide bridge and non-covalent interactions¹¹. The Hc mediates binding at the presynaptic surface and internalization by receptor-mediated endocytosis, followed by translocation of the light chain through the synaptic vesicle membrane into the cytoplasm. The Lc is a zinc-dependent endopeptidase which cleaves host proteins essential for neurotransmitter release, resulting in muscle paralysis⁹. The Hc domains of BoNT/A, B and E contain binding sites for a polysialo-ganglioside, in particular GT1b and a protein receptor, which confer neuro-specific binding with K_Ds in the 0.5 nM range^{12–14}. The protein receptors for BoNTs are intra-luminal domains of transmembrane synaptic vesicle proteins, which become accessible to the extracellular milieu after synaptic vesicle fusion. BoNT/A and BoNT/E share SV2 protein as their receptor, whereas BoNT/B binds to synaptotagmin 1 or 2 (SYT1 or 2), but has a higher affinity for SYT2^{11,15}. The standard method for quality control of pharmaceutical batches of BoNT is the mouse toxicity bioassay, which requires a large number of animals and is ethically controversial. Surrogate molecular assays capable of measuring the functionality of BoNT Hc and Lc *in vitro* are therefore urgently required. Highly sensitive assays for the enzymatic activity of the Lc from BoNT/A, B and E have been established^{16–18}. However, methods allowing detailed analysis of the binding parameters that determine neuro-specificity are lacking.

This study describes a new method to express full-length complex membrane receptor proteins targeted to exosomes. The exosomes were validated using conformation-dependent ligand binding to the voltage-gated potassium channel Kv1.2 and the G-protein coupled receptor CXCR4 and used to determine the kinetic and equilibrium binding constants of BoNT/B to its receptor.

Results

Exosomal expression of membrane proteins. A patented technology which sorts chosen membrane protein to exosomes, was used to express 5 different transmembrane proteins: the BoNT/B receptors synaptotagmin 1 and 2, the seven transmembrane domain G-protein-coupled receptor CXCR4, the voltage-gated potassium channel Kv1.2, and the type 1 membrane protein *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA1). A sequence encoding a peptide (DCTM), which promotes exosomal sorting¹⁹ (patent no. WO2009115561), was fused to the 3' end of each coding sequence cDNA and the resulting plasmids transfected in HEK cells. We established stable cell lines for synaptotagmins (SYTs) and transient expression for the other membrane proteins. Extracellular vesicles (exoKv1.2; exoCXCR4; exoAMA1; exoSYTs) were recovered from transfected HEK cell culture media and purified. The size of the membrane particles was evaluated by nanoparticle tracking analysis, yielding a mean diameter of 127 nm (Fig. 1A) for exoSYT2, consistent with the size of exosomes from HEK cells²⁰.

Exogenously expressed proteins were detected in purified exosomal fractions by Western blotting (Fig. 1). All observed molecular weights were compatible with the predicted size of the mature full-length recombinant proteins (arrowheads, Fig. 1B,C). PNGase F treatment of exoSYT1/2 resulted in an increase in mobility, indicating N-glycosylation (Fig. 1C).

It has been previously shown that structurally complex proteins, such as G protein-coupled receptors, are addressed to exosomes when transiently transfected in cultured cells (Estelle 2005). We thus evaluated the relevance of our approach in the case of CXCR4 and compared its expression level, in the presence or absence of the DCTM tag. Exosomes purified from CXCR4 or CXCR4-DCTM transfected cells were coated in ELISA plates and CXCR4 expression was measured using anti-CXCR4 antibody. As shown in Fig. 1D, addition of the DCTM tag resulted in an approximately 10-fold (9 ± 0.8 , $n = 3$ from 2 independent exosome preparations) increase in the expression of CXCR4.

Immunocharacterization of recombinant exosomes. To confirm the identity of the secreted membrane vesicles, we investigated the co-expression of exosomal surface markers in exoSYT2. Secreted membrane particles were captured on ELISA plates using specific antibodies and immobilized particles were probed with mAbs directed against exosomal surface markers. As shown in Fig. 2, immunocaptured SYT2 exosomes expressed three classical exosomal markers CD9, CD81 and CD63²¹. Similar results were obtained using exoCXCR4 (data not shown). A mAb directed against the N-terminal domain of SYT2, which is intraluminal in synaptic vesicles and extracellular at the neuronal plasma membrane recognized the immobilized particles in contrast to an absence of recognition by mAb1D12 that recognizes its cytoplasmic domain. These data indicated that as expected, the transmembrane orientation of SYT2 was identical to that in neuronal plasma membranes.

Surface plasmon resonance (SPR) was used to evaluate the expression level of recombinant SYT2 or CXCR4 in immunocaptured exosomes. Exosomes were specifically and stably captured on sensorchips and non-specific capture on control IgG was less than 10% of the total signal (Supplementary Fig. 1). Anti-SYT2 antibody and a conformation-dependent anti-CXCR4 antibody were then injected at saturating concentrations. mAb binding responses (R_{max}) reflected thus the total quantity of immobilized receptor. We found 0.07 RU (resonance units) of specific mAb/RU of immobilized exosomes for exoSYT2 and 0.1RU/RU for exoCXCR4, yielding a mean of 0.08 ± 0.01 RU ($n = 4$) of bound antibody per RU of immobilized exosomes (not shown). Assuming that 1RU of mAb bound = 1 pg/mm² of molecule²² on the exosome surface, a protein to lipid ratio of 2:1 (w:w) and that the molecular weight of SYT2/DCTM is 53 000 Da, one can calculate a content of 0.7–1.4 nmoles of SYT2/mg of protein. SYT2 would thus represent 3.6–7.2% of total proteins in SYT2 exosomes, depending on whether the mAb/SYT2 interaction is monovalent or bivalent. A comparison of this value with our previous results obtained in similar conditions with synaptic vesicles²² suggests that each exosome contains about 200 copies of exogenously expressed protein (see supplementary Methods).

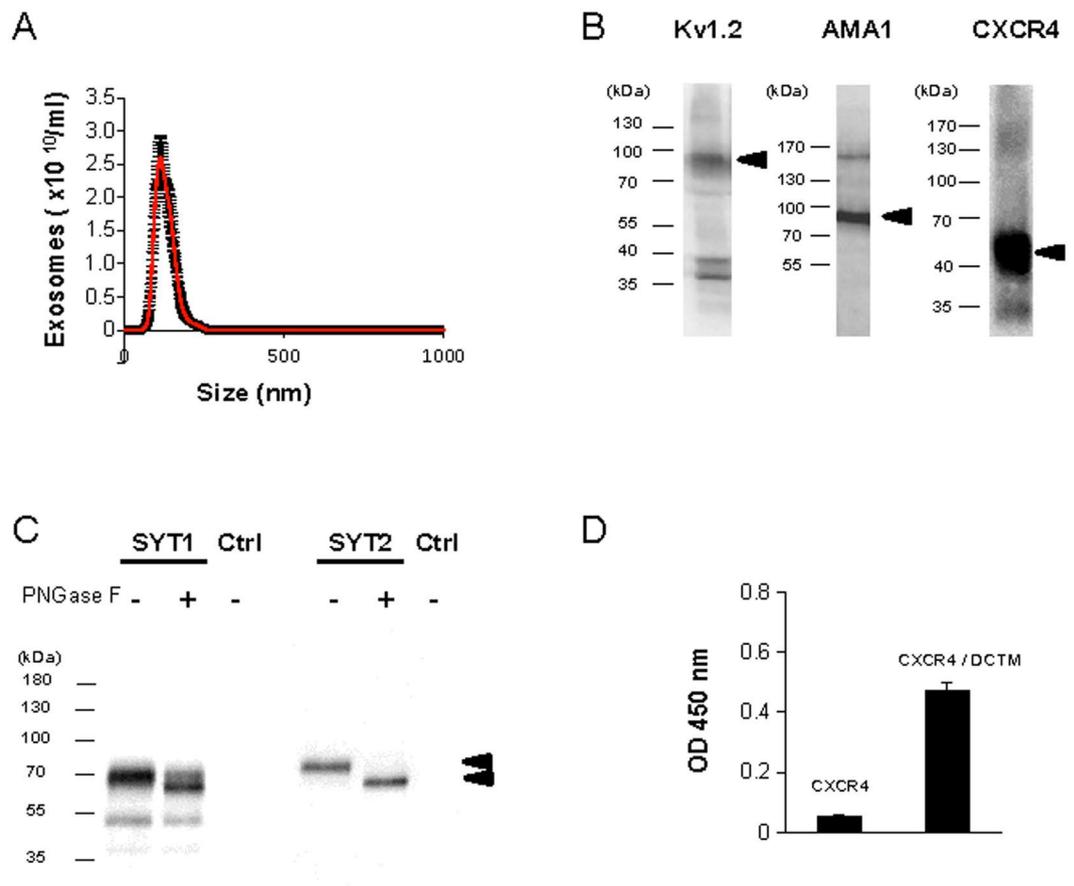


Figure 1. Expression of recombinant membrane proteins in exosomes. (A) Nanoparticle tracking analysis of purified exosomes yielded a mean size of 127 ± 30 nm (mean of 5 independent determinations). (B) Kv1.2, AMA1 and CXCR4 exosomal preparations were analyzed by Western blot using specific antibodies. Arrowheads indicate expected molecular weight. (C) ExoSYT1 and 2 were treated in the presence or absence of PNGase F and analyzed by Western blot using anti-SYT antibody (1D12). Exocontrol from non-transfected cells were used as a control (Ctrl). (D) Expression levels of CXCR4 in exosomal preparations with or without the presence of the DCTM peptide tag. The nonspecific signal has been subtracted. Error bars are SD from triplicates. Representative of 3 experiments using 2 independent exosomes preparations.

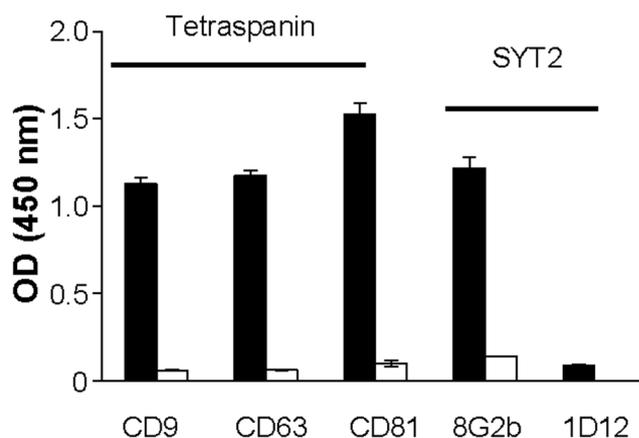


Figure 2. Characterization of SYT2-expressing exosomes. ExoSYT2 were captured on ELISA plates coated with anti-SYT2 (black bars) or anti-GST negative control antibodies (open bars). The presence of exosomal markers of the tetraspanin family (CD9, CD63 and CD81) was assessed using the corresponding antibodies. The orientation of SYT2 on captured exosomes (using mAb8G2b and mAb1D12 recognizing respectively the N-terminal and the cytosolic domains of SYT2) was verified. Error bars are SD from triplicates. Representative of 3 independent experiments.

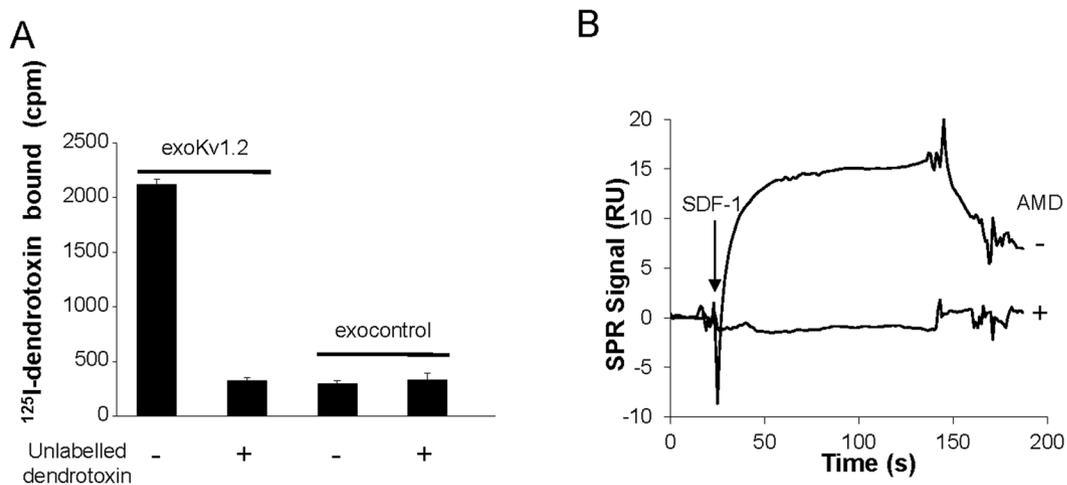


Figure 3. Measurement of ligand binding to exoKv1.2 and exoCXCR4. **(A)** Binding of ^{125}I -dendrotoxin to exoKv1.2. Exosomes were incubated with ^{125}I -dendrotoxin in the absence or presence of an excess of unlabelled dendrotoxin and bound toxin counted (cpm = counts per minute). Error bars are SD from triplicates. Representative from 4 independent experiments. **(B)** SDF1 binding to CXCR4 exosomes. The CXCR4 ligand SDF-1 (50 nM) was injected over exoCXCR4 immobilized on a chip. SDF-1 binding was measured and its specificity confirmed using the CXCR4 antagonist AMD3100 (10 μM). Note that, as SPR monitors the mass of bound analyte, AMD3100 binding was not detected owing to its low molecular mass relative to SDF-1. Representative SPR sensorgrams, after blank subtraction, from 3 independent experiments.

Ligand binding to membrane proteins expressed in exosomes. We used the binding of specific ligands to address the proper assembly and/or conformation of the tetrameric Kv1.2 channel or CXCR4 at the surface of exosomal membranes. Radiolabeled ^{125}I -dendrotoxin, a specific ligand that binds to an extracellular site on the Kv1.2 channel, was incubated with exoKv1.2, in the presence or absence of an excess of unlabelled toxin. Exosomes were then filtered to separate free and bound toxin. While dendrotoxin did not bind to exocontrol, robust specific binding to exoKv1.2 was measured (Fig. 3A). Excess unlabelled dendrotoxin competitively inhibited binding, reaching the background signal determined using control exosomes (Fig. 3A).

SPR spectroscopy was used as a label-free sensing method to measure the conformationally-sensitive binding of SDF-1 to exoCXCR4²³. To measure SDF-1 binding, sensor chips were functionalized independently on separate flowcells, with exoCXCR4 or exocontrol. SDF-1 binding to exoCXCR4 was quantified by automatically subtracting the non-specific signal obtained with exocontrol. As shown in Fig. 3B, SDF-1 (8 kDa) specifically bound to exoCXCR4 but binding was abolished if SDF-1 was injected in presence of the competitive antagonist AMD3100 (794 Da). These specific ligand-binding experiments suggest that recombinant proteins are expressed at the surface of exosomes with appropriate membrane topology and conformation.

ELISA detection of BoNT/B binding to exo SYT1/2. ELISA experiments showed that both GT1b and GD1a, the two main gangliosides that cooperate with SYT to form the high affinity BoNT/B binding site, were absent in exosomal preparations (Supplementary Fig. 2). Accordingly, no specific BoNT/B binding was measured by ELISA upon direct coating of exoSYT1, exoSYT2 when compared to the negative control exoAMA1 (Fig. 4A, $p > 0.05$, $n = 5$ independent experiments). As GT1b can spontaneously insert in lipid membranes, exosomes were pre-incubated with GT1b before BoNT/B binding. Under these conditions, BoNT/B binding was detected at the surface of exoSYT1/GT1b and exoSYT2/GT1b ($p < 0.05$, 6 independent experiments, Wilcoxon matched pairs test). In accordance with the reported lower affinity of BoNT/B for SYT1 versus SYT2, BoNT/B binding to exoSYT1/GT1b was weaker, compared to exoSYT2/GT1b (Fig. 4B). The recombinant form of the C-terminal domain of BoNT/B (HcB) also bound to exoSYT2/GT1b (Fig. 4C). In contrast, BoNT/A did not bind neither to exoSYT2 nor to exoSYT1 in presence or absence of GT1b (Supplementary Fig. 3). We checked if the ELISA detection of BoNT/B interaction with its receptor could be achieved in the presence of serum as the enzymatic activity of BoNT/B *in vitro* is largely inhibited under these conditions¹⁶. BoNT/B binding to SYT2/GT1b exosomes was readily revealed in the presence of 25% serum (Fig. 4D) and abrogated by pre-incubation of the toxin with neutralizing antibodies¹⁶, confirming binding specificity. Binding with serum gave higher signals than in its absence suggesting that unknown factors present in sera potentiate binding.

Biosensor determination of BoNT/B binding parameters in SYT2 exosomes. The binding affinity of BoNT/B was analyzed by SPR. ExoSYT2 and exoAMA1 were captured on sensor chips in separate flow cells, and GT1b was briefly loaded on immobilized exosomes before BoNT/B injection (Fig. 5A). Kinetic experiments were carried out by delivering increasing concentrations of BoNT/B, in a continuous flow, over both exoSYT2 and control exosomes. As BoNT/B binds the immobilized partner, the mass of material bound specifically to the surface increases with concentration as illustrated in Fig. 5B. Responses fit well to a 1:1 interaction model yielding a $K_D = 0.6 \pm 0.1$ nM (mean \pm sem from 6 independent experiments) for BoNT/B holotoxin with an association rate constant (k_{on}) of $2.3 \pm 1.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and a dissociation rate constant (k_{off}) of $1.3 \pm 0.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Table 1). Similar

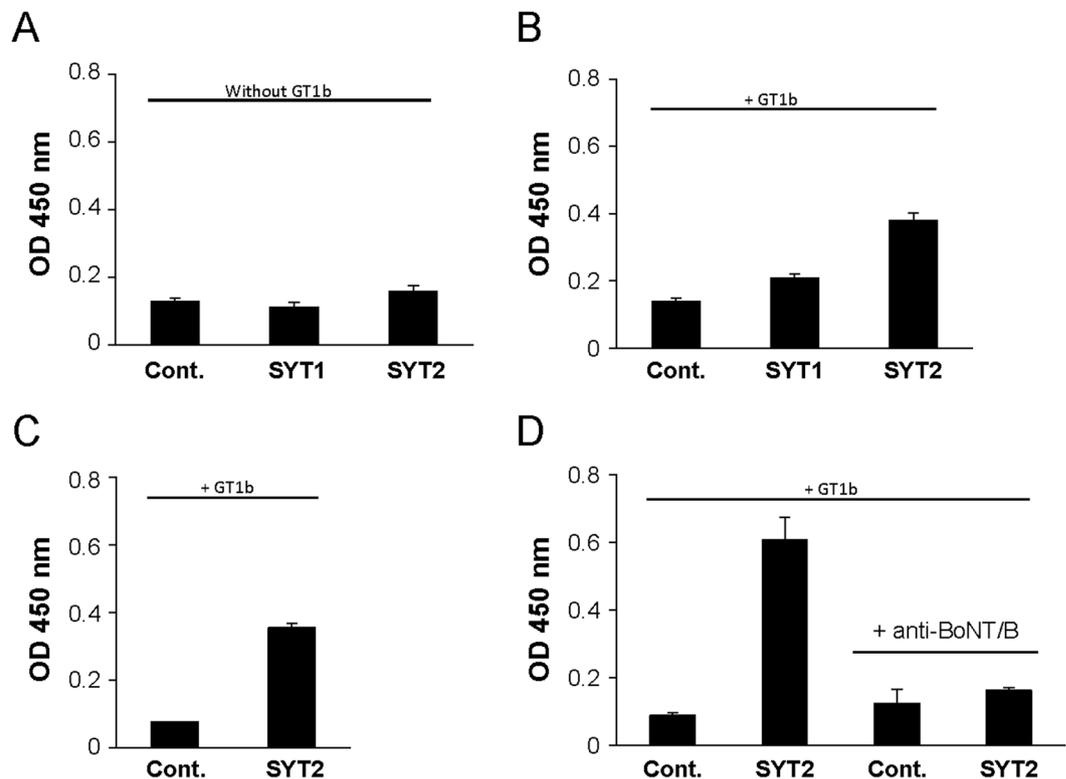


Figure 4. ELISA detection of BoNT/B interaction with exoSYT. (A,B) ExoSYT1, exoSYT2 and exoAMA1 (Cont) were directly coated on ELISA plates then loaded with (B) or without (A) GT1b and incubated with BoNT/B (10 nM). Binding was revealed using an anti-BoNT/B antibody. Results are representative of 5 ($p > 0.05$) (A) and 6 ($p < 0.05$) (B) independent experiments. (C) HcB (10 nM) binding to exoSYT2/GT1b was measured as described for BoNT/B representative of 2 independent experiments. (D) Same as in (B) but binding was performed in presence of 25% human serum. BoNT/B binding specificity was assessed using BoNT/B pre-incubated with affinity-purified anti-BoNT/B neutralizing antibodies. Error bars are SD from triplicates. Representative of 3 independent experiments using different sera.

values were obtained for BoNT/B (Table 1). Interestingly, while BoNT/B dissociated slowly (Fig. 5B), the isolated binding domain of BoNT/B (HcB) showed different kinetic characteristics (Fig. 5C). HcB bound very tightly to exoSYT2/GT1b with a $k_{off} < 10^{-5} s^{-1}$, precluding a precise affinity determination, as k_{off} was under the limit of detection of the apparatus. Flat sensorgrams obtained upon injection of increasing concentrations of BoNT/A, BoNT/E holotoxins or HcA over exoSYT2, illustrate binding specificity (Fig. 5B and C).

The equilibrium dissociation constant obtained from the kinetic parameters of BoNT/B binding to exoSYT2/GT1b was very close to reported K_D s measured at equilibrium using native nerve terminals^{12,14}, thus validating the exosome biosensor approach. However it should be noted that binding assays require nanomolar toxin concentrations and are not adapted to the detection of extremely low BoNT/B concentrations for diagnostics and surveillance.

Discussion

There is an increasing demand for simple molecular assays to measure precise binding properties of ligands to membrane receptors that are major drug targets. However, successful reconstitution of functional membrane proteins is an empirical process, depending on many factors that must be optimized, including the formation and composition of the lipid environment². We encountered this problem while developing cell-free biosensor assays to measure the affinity and kinetics of BoNT interactions with their membrane receptors. Reported binding assays, using full-length proteins or soluble domains of BoNT receptors, yielded affinities considerably lower than those found at synaptic terminals^{24–27}. In addition, cellular models are cumbersome and less suitable for reproducible affinity measurements. Exosomes potentially provide an ideal mini-cell-like model, due to their stability, with a high cholesterol content, and a uniform native membrane receptor orientation, with post-translational modifications. Several reports indicated that exosomes can be modified to express soluble proteins^{6,7}, however data concerning membrane protein targeting to exosomes are lacking. De Gassart and al.¹⁹, have demonstrated that the cytosolic domain of the transmembrane envelope (Env) protein of bovine leukemia virus contains motifs (DCTM) that potentially interact with the Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) machinery, and can be used to address the ecto-domain of CD8 to exosomes. We therefore set out to develop a novel general approach to address membrane proteins to exosomes for simple assays, which can be automated and applied, in many laboratory settings. We confirm and extend the use of this exosomal targeting sequence (DCTM) to express the voltage-gated potassium channel Kv1.2, the G-protein coupled receptor CXCR4,

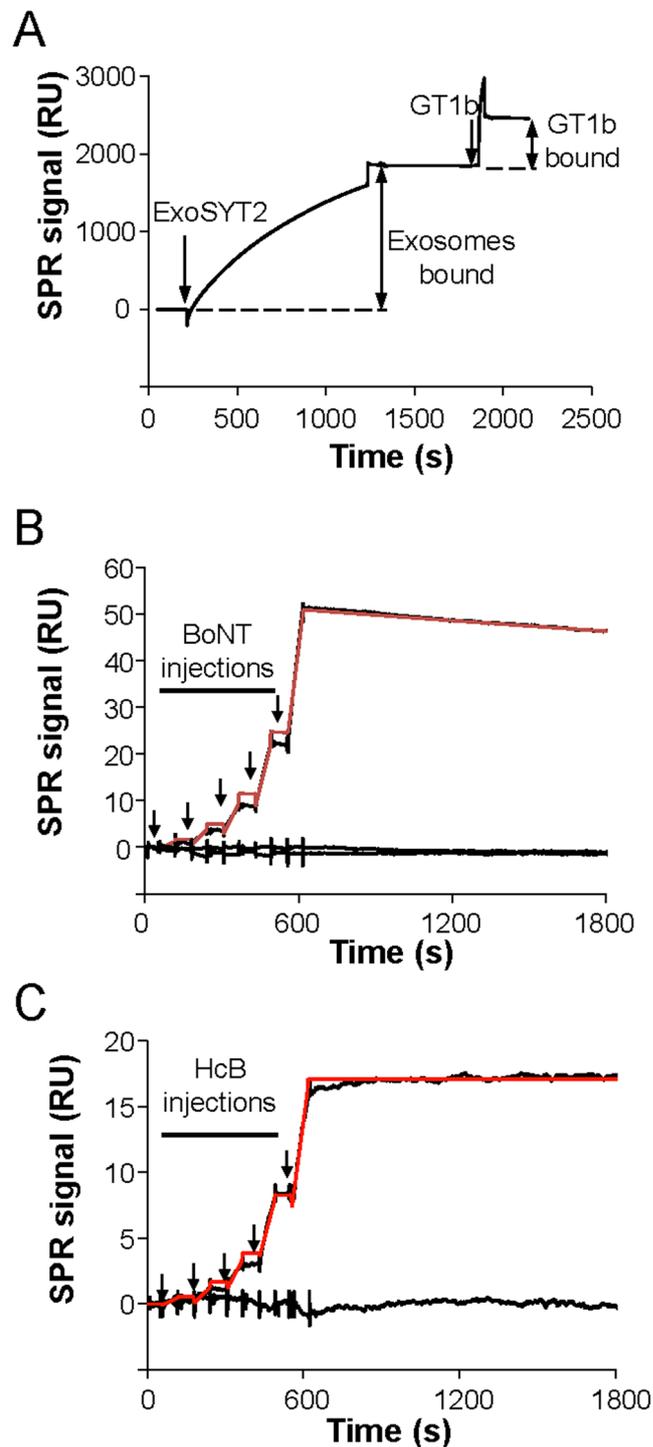


Figure 5. SPR measurements of BoNT/B and HcB affinity on immobilized exoSYT2/GT1b. **(A)** Functionalization of exoSYT2 flowcell: ExoSYT2 were injected into the flow-cell of a sensor chip with coupled anti-SYT mAb. Subsequent injection of GT1b (1 μ M) yielded an increase in RU illustrating online ganglioside insertion in exosomal membranes. **(B)** BoNT/B affinity determination: SPR analysis of the binding of BoNT/B holotoxin injected (arrows) in 2-fold dilutions from 1 to 16 nM to immobilized exoSYT2/GT1b and exoAMA1/GT1b. Data obtained on exoAMA1/GT1b were automatically subtracted from exoSYT2 measurements and only specific data presented. The red trace corresponds to fitted data. The lower traces correspond to injection of BoNT/A and BoNT/E holotoxins to exoSYT2. **(C)** HcB affinity determination: As in **(B)** using HcB (arrows) instead of BoNT/B. Red trace corresponds to theoretical fitting. The lower trace corresponds to specific measurement of HcA binding to exoSYT2.

Toxin (subtype)	M W (kDa)	Activity (LD ₅₀ /mg)	k _{on} × 10 ⁵ (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} × 10 ⁻⁴ (s ⁻¹)	K _D (nM)	n
BoNT/B holotoxin (B1)	150	0.5 × 10 ⁸	2.3 ± 1	1.3 ± 0.5	0.6 ± 0.1	6
BoNT/B (B1)	550	1.2 × 10 ⁷	3.1 ± 1.2	4.1 ± 1.4	1.4 ± 0.2	4
HcB (B2)	50	—	nd	<0.1	nd	4

Table 1. Affinity constants of BoNT/B and HcB for exoSYT2/GT1b. n = independent experiments; nd = not determined; Values are mean ± SEM.

as well as the BoNT/B receptors SYT1 and SYT2. All recombinant proteins were properly oriented in vesicles which expressed typical tetraspanin exosomal markers. However, we did not investigate whether the transfected proteins were expressed in all exosomes or whether they were also present in other types of secreted vesicular particles. SPR chips were functionalized with specific antibodies, allowing exosomes to be captured and stably immobilized. As little as 500 pg of immobilized exosomes were enough to measure BoNT/B binding. We estimate that there are about 200 copies of SYT2 or CXCR4 per exosome. This high copy number was indirectly confirmed by SPR measurement of binding of the relatively small analyte SDF-1 (8 kDa) to CXCR4 exosomes. Our method clearly increased specific targeting to exosomes, compared to viral overexpression of a GPCR in the absence of a particular tag²⁸.

Expression of the homo-tetrameric Kv1.2, CXCR4 and botulinum neurotoxin type B (BoNT/B) receptors in functional conformation was demonstrated in several binding assay formats: filtration assay, ELISA and SPR. The potential of this methodology was illustrated by measuring BoNT/B binding by ELISA and SPR to a double receptor consisting of SYT and the ganglioside GT1b. The ELISA method is effective in the presence of serum and could therefore be used to develop anti-BoNT/B antibodies, which are currently the only treatment for intoxication²⁹ and to screen for new antidotes acting on either the native receptor or the toxin. The exosome-based method, with a fully native double receptor, represents a flexible and more physiological context than minimal BoNT binding peptides. Furthermore, repeated injections of BoNT/B for clinical applications produce anti-toxin antibodies in a small number of patients³⁰. The exosome assay could be used to determine whether these antibodies reduce therapeutic efficacy by perturbing BoNT/B binding to its receptor. It is however important to note that the exosome-based assay is not sensitive enough for direct detection of BoNT/B in the serum of patients with type B botulism, as toxin concentrations in this case are very low. Multi-step, sensitive (fM to pM) methods are commonly used to reveal, through the detection of its enzymatic activity, BoNT/B binding to native receptors³¹ or recombinant peptide-based receptors^{32, 33}. A consecutive enzymatic assay should significantly increase the sensitivity of our system^{16, 34}. The native double receptor for BoNT/B i.e. synaptotagmin/GT1b was successfully reconstituted yielding K_Ds similar to those measured using native membranes. Studies using SYT peptides have always yielded lower affinities^{24, 26, 27} and fail to reconstitute the double receptor. However, due to the native origin of exosomes, the copy number of BoNT receptors per exosome is significantly lower than peptide concentrations that can be coated on beads. Therefore, this test is neither appropriate for the detection of minute amounts of BoNT nor can it recapitulate all the BoNT intoxication steps. However it allows analysis of binding parameters independently from enzymatic activity. To date relatively cumbersome cell culture, *ex-vivo* methods and the mouse bioassay can evaluate all three functions necessary for toxicity (binding, translocation, endoprotease activity).

In this study, we used a SPR biosensor to establish a simplified automated assay for BoNT/B binding to exoSYT2. Using two different BoNT/B sources K_D values derived from kinetic constants were close to those using ¹²⁵I-BoNT/B at equilibrium with nerve terminals or SYT2/GT1b proteoliposomes, thus validating the accuracy of our approach^{14, 15}. Interestingly, the exosomal approach circumvents time-consuming detergent reconstitution procedures required to prepare proteoliposomes. Even though exosome purification involves multiple steps, a single exoSYT2 preparation provides sufficient material for more than 100 binding tests and can be frozen for long periods without degradation. Curiously, HcB, the BoNT/B domain that binds to SYT2, displayed a higher affinity than BoNT/B holotoxin, owing to an extremely slow dissociation phase. The difference in off-rate may reflect a reduced spatial restriction for HcB compared to BoNT/B, to accommodate the double SYT2/GT1b receptor²⁶. Alternatively this might be explained by differences in affinity of BoNT subtypes, as it was reported that BoNT/B2 may be more active than BoNT/B1²⁹. This finding could be of specific importance since HcB has potential for the development of protective recombinant vaccines against botulism, and to target specific drugs to nerve terminals^{35, 36}.

In conclusion, we have developed a new approach to express membrane proteins in exosomes providing detailed information on ligand-receptor interactions using biosensors. We focused on measuring the affinity of BoNT/B for its receptor, as precise determination of binding parameters can constitute a key factor in using BoNTs as therapeutic agents. Exosomes thus constitute a useful nanoscale system for manipulating membrane proteins in robust soluble structures for analysis of molecular interactions, vaccine production as well as screen for drugs that specifically target receptors embedded in exosomal membranes.

Methods

Chemical and reagents. Unless otherwise stated, chemicals and Nunc Maxisorp 96 well ELISA plates were from Sigma. BoNT/A (A1 Hall strain; 1 mg/ml) and BoNT/B (B1 Okra strain; 1 mg/ml) neurotoxins with non-toxic accessory proteins, subsequently designated as BoNT, were obtained from Metabiotics (Madison, WI). Pure holotoxins type A (A1; 0.9 mg/ml), B (B1; 1 mg/ml) and E1 (0.7 mg/ml) were generously provided by S.

Kozaki³⁷. All experiments were performed in accordance with French and European guidelines for handling botulinum neurotoxins. His-tagged HcB (from BoNT/B2 heavy chain, amino acids 861–1291)²⁹, HcA (amino acids 1096–1296)³⁸ as well as affinity-purified polyclonal anti-BoNT/B antibody¹⁶ were described previously. Polyclonal anti-BoNT/A and anti-BoNT/B antibodies were purchased from Metabio. The following monoclonal antibodies were from the following sources: CD9 (MEM-61, Abcam), CD63 (TS63, Abcam), CD81 (1D6, Abcam), GT1b (MAB5608, Millipore), GD1a (A2507, AMSbio), Kv1.2 (Cl. K14/16, NeuroMab), CXCR4 (44717, R&D system), AMA1 (clone CL22 gift from J. F. Dubremetz). Polyclonal antibody anti-SYT2, mAb 8G2b and mAb5b7a directed against a 20 amino acid peptide corresponding to the N-terminal rat SYT2 sequence and mAb 1D12 recognizing a cytosolic domain of SYT1/2 were generously provided by M. Takahashi^{12,39}. Goat anti-GST polyclonal antibodies were from GE Healthcare Life Sciences and HRP coupled secondary antibodies were from Interchim. TMB (3,3',5,5-tetramethylbenzidine) was from Uptima. ¹²⁵I α -dendrotoxin was from PerkinElmer, gangliosides GT1b from Calbiochem. Recombinant SDF-1 α protein and AMD3100 were obtained from R&D systems. Healthy human sera were obtained from the “Etablissement Français du Sang”. HEK cells were from ATCC: [HEK 293T/17] (ATCC[®] CRL-11268[™]).

DNA. Nucleic acid sequences encoding human synaptotagmin 1 (SYT1h; NP_005630.1), rat synaptotagmin 2 (SYT2r; NP_036797.1), *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen 1 homolog (AMA1Tg, GenBank: AF010264.1), human C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4, GenBank: AY242129.1), and human Kv1.2 channel (XP_011539702.1) were cloned in the expression plasmid pCA-IZ (Cilco Co.). These coding sequences were inserted 5' of and in frame with the DCTM coding peptide (5.3 kDa) sequence both being upstream of an IRES that allows the translation of a Zeocin resistance gene. Control exosomes (exocontrol) were produced and purified from cells transfected with pCA-IZ without additional insert. CXCR4 exosomes were produced also from pCILA-IZ plasmid devoid of DCTM encoding sequence.

Transient transfection and generation of stable cell lines. Plasmids were transfected in HEK 293T cells (about 1.10^6 per well) using JETPrime[®] (Polyplus Transfection). In order to generate stable cell lines for SYT1h and SYT2r, transfected cells were plated at very low density, cultured for 10–14 days in complete culture medium (DMEM (GIBCO 41965-039) supplemented with 2 mM Glutamax (GIBCO 35050-061), 20 μ g/ml Gentamicin (GIBCO 17510-080) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum in the presence of Zeocin (400 μ g/ml). Clonal cell populations were isolated using an agarose-based cloning rings anchoring method⁴⁰.

Exosome production and purification. Exosomes were produced and purified either from transiently or stably transfected cells ($60\text{--}250 \times 10^6$). The culture medium was collected after 2 to 3 days and exosomes enriched as follows: Supernatants of two consecutive centrifugations 10 min at 300 g and 15 min at 10,000 g were filtered through 0.22 μ m membrane filters (Millipore Stericup filter) and centrifuged for an additional 2 h at 220,000 g using Beckman LB-70M ultracentrifuge. Pellets were resuspended overnight in 2 ml EB (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4) and centrifuged again. The final pellet was resuspended in 1 ml EB. For large production ($>400 \times 10^6$ cells) of exosomes from synaptotagmin expressing stable cell lines, ultrafiltration (300 kDa MWCO), centrifugation and gel filtration were performed to concentrate and increase exosomes purity⁴¹. Similar production method was performed with mock-transfected HEK cells to prepare control exosomes (exocontrol). Exosomes were aliquoted and stored at -20°C .

Exosome sizing. 0.1 μ g of exosomal solution diluted in Milli-Q[®] ultrapure water was sized using Nanoparticle Tracking Analysis (NanoSight NS300). Data were collected for 60 s and analyzed using NanoSight NTA 2.3 software.

Western blots. 3 μ g of each exosomal preparation were analyzed by Western blotting, revealed with the ECL system (Amersham Biosciences). Peptide -N-Glycosidase F (PNGase F) deglycosylation of SYT1 and SYT2 exosomal preparations was carried out following manufacturer's instructions (New England Biolabs).

¹²⁵I-dendrotoxin binding assays. 2 μ g Kv1.2-expressing exosomes (exoKv1.2) were incubated at room temperature for 60 min with 0.7 nM ¹²⁵I-dendrotoxin in 100 μ l 0.1% TBSA (10 mM Tris-Cl pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin (BSA)) in the absence or presence of 1 μ M unlabelled dendrotoxin. Incubation was followed by rapid filtration over glass-fiber filters (Whatman GF/B) pretreated with 0.3% aqueous polyethyleneimine. Filters were washed 3 times with 0.1% TBSA at 4 $^\circ\text{C}$ and counted on a gamma counter.

ELISA detection of exosomal markers. ExoSYT2 (2 μ g/well) in 0.1% TBSA were captured on 3% TBSA blocked ELISA wells, precoated with polyclonal anti-SYT2 or control anti-GST antibodies. Steps were preceded by washing with 0.1% TBSA. The following mAb antibodies were added and incubated for 1 h at 37 $^\circ\text{C}$ (2 μ g/ml): anti-CD9, anti-CD63, anti-CD81, anti-synaptotagmin2 (8G2b), or anti-synaptotagmin 1/2 (1D12) in 0.1% TBSA. Donkey anti-mouse-HRP conjugated antibodies were then used and HRP activity measured at OD_{450nm} after addition of TMB and stopping the reaction by acidification.

ELISA detection of BoNT/A and B binding to exosomes. Exosomes (1 μ g protein per well) were directly adsorbed in ELISA wells in 200 mM Na₂HCO₃ pH 8.9. Steps were preceded by washing at room temperature using 0.1% TBSA. Wells were blocked with 3% TBSA and GT1b (4.5 μ M) was added in TBS and incubated for 30 min at 37 $^\circ\text{C}$. Plates were then incubated for 1 h at 37 $^\circ\text{C}$ with BoNT/B or BoNT/A in complex (10 nM) or HcB. Depending on experiments, BoNTs were added in 0.1% TBSA with or without 25% healthy human serum. Polyclonal anti-BoNT/B antibodies (1 μ g/ml) were added and incubated for 1 h at 37 $^\circ\text{C}$. Goat anti-rabbit-HRP

conjugated antibodies were added and HRP activity measured at OD_{450nm} after addition of TMB and stopping the reaction by acidification.

ELISA detection of CXCR4. CXCR4 (ExoCXCR4) or DCTM-fused CXCR4 expressing exosomes (exo-CXCR4/DCTM) were produced and purified under the same conditions. Both exoCXCR4 and exoCXCR4/DCTM (37,5 ng/well) were directly adsorbed in ELISA wells. Wells were blocked using Phosphate buffered Saline (PBS) containing 3% BSA, for 1 hour at 37 °C. Every subsequent step was preceded by washing using PBS supplemented with 0.05% Tween. Anti- CXCR4 (1 µg/ml) antibodies were incubated for 2 h at 37 °C in PBS and secondary HRP conjugated antibodies were added. HRP activity was measured at OD_{450nm} after addition of TMB and stopping the reaction by acidification.

ELISA detection of gangliosides. ExoSYT2 were captured and gangliosides detected using mAb anti GT1b (ascites diluted at 1/4000) and GD1a (2.5 µg/ml). Non-specific binding measured from control wells without exosomes was subtracted. Positive control for GT1b was performed by pre-incubating exosomes with exogenous GT1b 8 µM. HRP activity on secondary antibodies was measured at OD_{450nm} after addition of TMB and stopping the reaction by acidification.

Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments. SPR measurements were performed at 25 °C using Biacore 3000 or Biacore T200 (GE Healthcare) apparatus. HBS (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES)/NaOH pH 7.4, 150 mM NaCl) was used as running buffer and sensorchips were either CM5 from GE Healthcare or chip without dextran from Xantec (2D carboxymethyl dextran surface CMDP). Sensorchips were functionalized by covalently coupling mAb antibodies recognizing CD81, CXCR4 or SYT2 (5B7a) using standard amine coupling chemistry (800–1200 RU on CMDP chip). Exocontrol or exoAMA1 were captured on flow cells functionalized with anti-exosomal marker CD81 antibody and used as negative control. ExoSYT2 were captured using 5B7a or anti-CD81 antibodies. Exosomes (0.3 mg/ml) were injected at a flow rate of 1 µl/min. The amount of bound exosomes varied between experiments and ranged from 500 to 2500 RU. For experiments involving exoSYT2, GT1b (1 µM) was added to pre-immobilized exosomes with a flow rate of 10 µl/min and the loading stopped upon reaching 1/3 of the exosome mass. Taking a mean molecular weight of 50 kDa for proteins and 2.2 kDa for GT1b, a protein to lipid ratio of 2 (w:w) similar to synaptic vesicles⁴², we calculated a molar ratio GT1b/total proteins of 10. Exosomes/GT1b were used for binding experiments at least 2 hours after GT1b loading. Five different concentrations of analytes, prepared by twofold dilutions ranging from 1 to 16 nM or 2 to 32 nM, were placed on the Biacore sample rack at 4 °C and assayed across the control and SYT2 exosomes surfaces at a flow rate of 30 µl/min. The data obtained from the control flow cell were automatically subtracted from experimental measurements to yield the specific signal. Data were analyzed using Biacore T200 Evaluation software 2.0 or BIAevaluation software 4.1 (GE Healthcare). The single-cycle kinetic method was used in affinity measurements and K_D values (k_{off}/k_{on}) were calculated with the 1:1 titration kinetic binding model. Chips were regenerated using 100 mM octylglucoside as described⁴³ and used several times.

Statistical analysis. Values presented are mean ± standard error of the mean (SEM) or mean ± standard deviation (SD). Statistical differences were assessed using the Wilcoxon matched-pair test. A p value < 0.05 was considered to be significant.

References

- Patching, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 43–55, doi:10.1016/j.bbammem.2013.04.028 (2014).
- Shen, H. H., Lithgow, T. & Martin, L. Reconstitution of membrane proteins into model membranes: seeking better ways to retain protein activities. *Int J Mol Sci* **14**, 1589–1607, doi:10.3390/ijms14011589 (2013).
- Im, H. *et al.* Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol* **32**, 490–495, doi:10.1038/nbt.2886 (2014).
- Zhou, Q. *et al.* Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes. *Methods* **97**, 88–93, doi:10.1016/j.ymeth.2015.10.012 (2016).
- Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* **29**, 341–345, doi:10.1038/nbt.1807 (2011).
- Yim, N. *et al.* Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein-protein interaction module. *Nat Commun* **7**, 12277, doi:10.1038/ncomms12277 (2016).
- Zeelenberg, I. S. *et al.* Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles *in vivo* induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res* **68**, 1228–1235, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3163 (2008).
- Hartman, Z. C. *et al.* Increasing vaccine potency through exosome antigen targeting. *Vaccine* **29**, 9361–9367, doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.133 (2011).
- Peng Chen, Z. *et al.* Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins. *Toxins (Basel)* **4**, 1196–1222, doi:10.3390/toxins4111196 (2012).
- Masuyer, G., Chaddock, J. A., Foster, K. A. & Acharya, K. R. Engineered botulinum neurotoxins as new therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **54**, 27–51, doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-135935 (2014).
- Rossetto, O., Megighian, A., Scorsetto, M. & Montecucco, C. Botulinum neurotoxins. *Toxicon* **67**, 31–36, doi:10.1016/j.toxicon.2013.01.017 (2013).
- Nishiki, T. *et al.* The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett* **378**, 253–257, doi:10.1016/0014-5793(95)01471-3 (1996).
- Williams, R. S., Tse, C. K., Dolly, J. O., Hambleton, P. & Melling, J. Radioiodination of botulinum neurotoxin type A with retention of biological activity and its binding to brain synaptosomes. *European Journal of Biochemistry* **131**, 437–445, doi:10.1111/ejb.1983.131.issue-2 (1983).
- Evans, D. M. *et al.* Botulinum neurotoxin type B. Its purification, radioiodination and interaction with rat-brain synaptosomal membranes. *European Journal of Biochemistry* **154**, 409–416, doi:10.1111/ejb.1986.154.issue-2 (1986).

15. Kozaki, S., Kamata, Y., Watarai, S., Nishiki, T. & Mochida, S. Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins. *Microb Pathog* **25**, 91–99, doi:10.1006/mpat.1998.0214 (1998).
16. Ferracci, G. *et al.* A label-free biosensor assay for botulinum neurotoxin B in food and human serum. *Anal Biochem* **410**, 281–288, doi:10.1016/j.ab.2010.11.045 (2011).
17. Liu, Y. Y., Rigsby, P., Sesardic, D., Marks, J. D. & Jones, R. G. A functional dual-coated (FDC) microtiter plate method to replace the botulinum toxin LD50 test. *Anal Biochem* **425**, 28–35, doi:10.1016/j.ab.2012.02.038 (2012).
18. Leveque, C. *et al.* An optical biosensor assay for rapid dual detection of Botulinum neurotoxins A and E. *Sci Rep* **5**, 17953, doi:10.1038/srep17953 (2015).
19. De Gassart, A. *et al.* Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein. *Cell Biol Int* **33**, 36–48, doi:10.1016/j.cellbi.2008.10.001 (2009).
20. Sokolova, V. *et al.* Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **87**, 146–150, doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.013 (2011).
21. Colombo, M., Raposo, G. & Thery, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 255–289, doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326 (2014).
22. Ferracci, G., Seagar, M., Joel, C., Miquelis, R. & Leveque, C. Real time analysis of intact organelles using surface plasmon resonance. *Anal Biochem* **334**, 367–375, doi:10.1016/j.ab.2004.08.002 (2004).
23. Navratilova, I., Sodroski, J. & Myszkka, D. G. Solubilization, stabilization, and purification of chemokine receptors using biosensor technology. *Anal Biochem* **339**, 271–281, doi:10.1016/j.ab.2004.12.017 (2005).
24. Berntsson, R. P., Peng, L., Dong, M. & Stenmark, P. Structure of dual receptor binding to botulinum neurotoxin B. *Nat Commun* **4**, 2058, doi:10.1038/ncomms3058 (2013).
25. Yao, G. *et al.* N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 656–662, doi:10.1038/nsmb.3245 (2016).
26. Jin, R., Rummel, A., Binz, T. & Brunger, A. T. Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* **444**, 1092–1095, doi:10.1038/nature05387 (2006).
27. Chai, Q. *et al.* Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* **444**, 1096–1100, doi:10.1038/nature05411 (2006).
28. Estelles, A. *et al.* Exosome nanovesicles displaying G protein-coupled receptors for drug discovery. *Int J Nanomedicine* **2**, 751–760 (2007).
29. Rasetti-Escargueil, C. *et al.* Development of human-like scFv-Fc antibodies neutralizing Botulinum toxin serotype B. *MAbs* **7**, 1161–1177, doi:10.1080/19420862.2015.1082016 (2015).
30. Dressler, D., Lange, M. & Bigalke, H. Mouse diaphragm assay for detection of antibodies against botulinum toxin type B. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* **20**, 1617–1619, doi:10.1002/mds.20625 (2005).
31. Evans, E. R., Skipper, P. J. & Shone, C. C. An assay for botulinum toxin types A, B and F that requires both functional binding and catalytic activities within the neurotoxin. *J Appl Microbiol* **107**, 1384–1391, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04325.x (2009).
32. Rosen, O., Ozeri, E., Barnea, A., David, A. B. & Zichel, R. Development of an Innovative *in Vitro* Potency Assay for Anti-Botulinum Antitoxins. *Toxins (Basel)* **8**, 10.3390/toxins8100276 (2016).
33. Wild, E. *et al.* *In vitro* potency determination of botulinum neurotoxin B based on its receptor-binding and proteolytic characteristics. *Toxicol In Vitro* **34**, 97–104, doi:10.1016/j.tiv.2016.03.011 (2016).
34. Ferracci, G., Miquelis, R., Kozaki, S., Seagar, M. & Leveque, C. Synaptic vesicle chips to assay botulinum neurotoxins. *Biochem J* **391**, 659–666, doi:10.1042/BJ20050855 (2005).
35. Ben David, A., Torgeman, A., Barnea, A. & Zichel, R. Expression, purification and characterization of the receptor-binding domain of botulinum neurotoxin serotype B as a vaccine candidate. *Protein Expression and Purification* **110**, 122–129, doi:10.1016/j.pep.2015.02.008 (2015).
36. Drachman, D. B., Adams, R. N., Balasubramanian, U. & Lu, Y. Strategy for treating motor neuron diseases using a fusion protein of botulinum toxin binding domain and streptavidin for viral vector access: work in progress. *Toxins (Basel)* **2**, 2872–2889, doi:10.3390/toxins2122872 (2010).
37. Sakaguchi, G. Clostridium botulinum toxins. *Pharmacol Ther* **19**, 165–194, doi:10.1016/0163-7258(82)90061-4 (1982).
38. Couesson, A., Molgo, J., Connan, C. & Popoff, M. R. Preferential entry of botulinum neurotoxin A Hc domain through intestinal crypt cells and targeting to cholinergic neurons of the mouse intestine. *PLoS Pathog* **8**, e1002583, doi:10.1371/journal.ppat.1002583 (2012).
39. Shoji-Kasai, Y. *et al.* Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells. *Science* **256**, 1821–1823, doi:10.1126/science.256.5065.1820 (1992).
40. Mathupala, S. & Sloan, A. A. An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. *Biotechniques* **46**, 305–307, doi:10.2144/000113079 (2009).
41. Taylor, D. D. & Shah, S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* **87**, 3–10, doi:10.1016/j.ymeth.2015.02.019 (2015).
42. Takamori, S. *et al.* Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831–846, doi:10.1016/j.cell.2006.10.030 (2006).
43. Marconi, S. *et al.* A protein chip membrane-capture assay for botulinum neurotoxin activity. *Toxicol Appl Pharmacol* **233**, 439–446, doi:10.1016/j.taap.2008.09.005 (2008).

Acknowledgements

We would like to acknowledge the financial support of INSERM and the joint INSERM/Région Provence-Alpes-Côte d’Azur/Ciloa PhD fellowship for R.D. We also thank Yves Maulet for critical reading of the manuscript and Nicole Moutot for dentrotoxin binding experiments.

Author Contributions

M.S., O.E.F. and C.L. conceived and designed the study. R.D., C.L., B.M., M.L. and G.F. carried out the experiments and performed the data analysis. M.P. and R.M. provided experimental tools. The manuscript was written by C.L., M.S. and O.E.F. All authors discussed the results, reviewed and commented on the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-01198-1

Competing Interests: R.M., M.L. and B.M. are current or former members of Ciloa SA, a company developing bespoke exosomes. C.L., M.S. and O.E.F. have applied for a patent using Ciloa SA technology.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Supplementary methods

Affinity biosensors using recombinant native membrane proteins displayed on exosomes: application to botulinum neurotoxin B receptor

Richard Desplantes^{a,c}, Christian Lévêque^{a,c}, Benjamin Muller^d, Manuela Lotierzo^d, Géraldine Ferracci^{b,c}, Michel Popoff^e, Michael Seagar^{a,c}, Robert Mamoun^d, and Oussama El Far ^{a,c*}

Enrichment of recombinant molecules in exoSYT2 and exoCXCR4:

CXCR4 or SYT2/GT1b exosomes were captured using anti-CXCR4 or anti-SYT2 antibodies immobilized on a chip without dextran. R_{max} in RU units was then measured by injecting anti-CXCR4 antibodies or anti-SYT2 antibodies (5B7a) at a saturating concentration (330 nM). Previous studies have shown that anti-VAMP mAb injected at saturation over synaptic vesicles immobilized on a sensorchip give a value of 0.084 RU of mAb per RU of immobilized synaptic vesicle (Ferracci et al. 2004). The number of copies of VAMP per synaptic vesicle was then estimated to be 70 (Takamori et al. 2006). Taking into account that exosomes have a diameter twice that of synaptic vesicles, for the same mass of vesicles immobilized on a chip, there will be 4-fold less exosomes. As anti-SYT antibody binding gave 0.07RU per RU of exosomes, one can calculate that exosomes express at least 3.3 times ($4 \times 0.07/0.084$) more copies of SYT than VAMP in synaptic vesicles, i.e 231 copies.

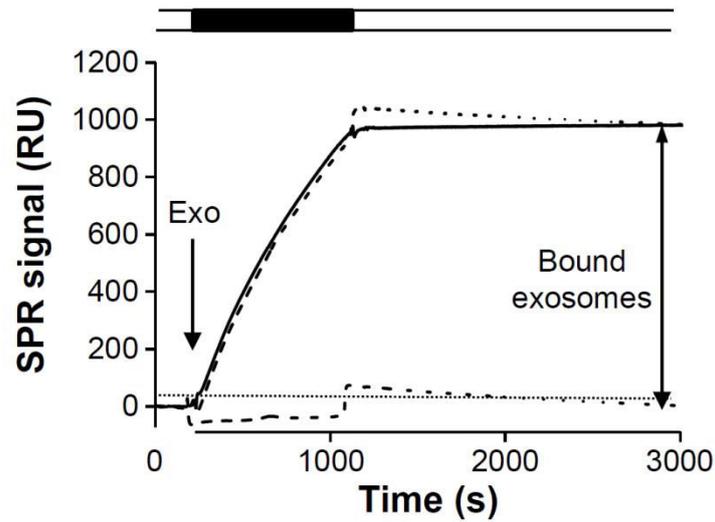


Fig. S1. Specific immobilization of exoSYT2 on a sensor chip. Exosomes were injected (black bar) over immobilized anti-SYT2 antibodies 8G2b (upper dashed trace) and control IgG (lower dashed trace). The specific binding (continuous line) corresponds to the subtraction of the lower from the upper dashed trace. Exosomes remained stably immobilized during running buffer injection (open bar).

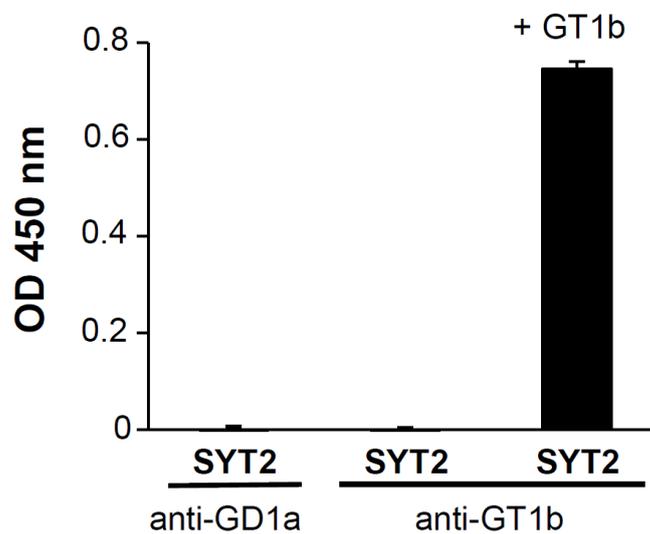


Fig. S2. exoSYT2 do not express GT1b or GD1a. ExoSYT2 were captured on ELISA plates using polyclonal anti-SYT2 antibodies. Anti-GT1b and GD1a antibodies were used to detect endogenous gangliosides. Neither GT1b nor GD1a were expressed while GT1b was detected when added exogenously. Representative of 2 independent experiments.

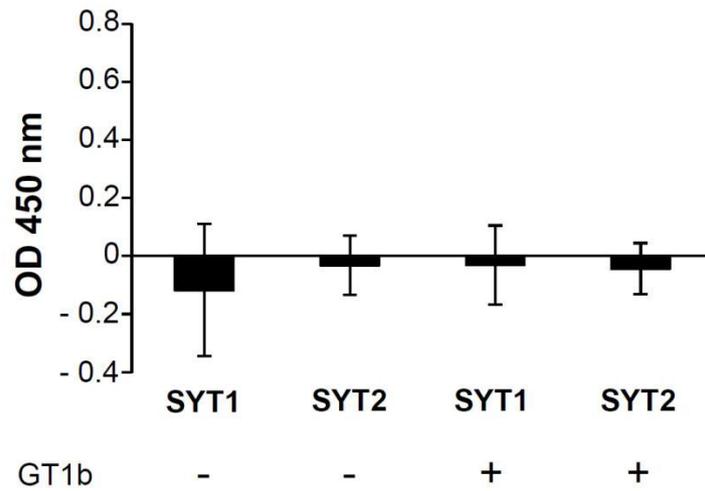


Fig. S3. Absence of BoNT/A binding to exoSYT1 and exoSYT2. BoNT/A (10 nM) was incubated with SYT1 and SYT2 exosomes in the presence or absence of GT1b and binding detected using anti-BoNT/A antibodies. Non-specific binding to control exosomes has been subtracted. Representative of 2 independent experiments.

3. Conclusions

Dans cette étude, nous avons développé une approche générale permettant d'augmenter l'adressage de protéines membranaires dans des vésicules de type exosomes. Pour cela, nous avons exploité une séquence d'adressage proche de celle précédemment identifiée comme étant responsable de la vectorisation d'un peptide dérivé de la protéine CD8 dans les exosomes (De Gassart et al., 2009). Dans une première partie, nous avons caractérisé les vésicules au sein desquelles nous avons dirigé l'expression de plusieurs récepteurs membranaires (CXCR4, Kv1.2, AMA1, SYT1 et SYT2). Les exosomes ont été purifiés/enrichis sur la base d'un protocole de centrifugations différentielles qui, dans certains cas, a été agrémenté par des étapes supplémentaires comprenant notamment une centrifugation sur coussin de sucrose suivi d'un tamisage moléculaire par gel-filtration. Sur la base de leur taille, de la méthode de purification employée ainsi que de la présence de marqueurs de surface de la famille des tétraspanines, nous avons validé l'identité exosomale de nos vésicules. De plus, nous avons relevé plusieurs éléments indiquant que les protéines membranaires sont exprimées dans les exosomes sous une forme proche de leur forme native. En effet, les récepteurs exprimés présentent des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la même orientation homogène qu'à la membrane plasmique, et ont la capacité de lier des ligands connus pour être sensibles à l'état de conformation ou d'oligomérisation de leurs récepteurs.

Dans une seconde partie, nous avons utilisé le potentiel de cette méthodologie pour examiner la liaison de la BoNT/B sur son double récepteur constitué par la SYT et les gangliosides. Premièrement, nous avons mis au point un test de détection de liaison de BoNT/B en ELISA avec des exosomes exprimant la SYT1 ou la SYT2. Les résultats obtenus en présence ou absence de gangliosides sont en accord avec les données de la littérature concernant la dépendance de cette liaison envers les gangliosides. Aussi, le fait que le test soit fonctionnel en présence de sérum ouvre des perspectives pour de nouveaux tests de détection d'autoanticorps anti-BoNTs que développent certains patients, ou encore la validation de nouveaux inhibiteurs de la liaison des BoNTs sur leurs récepteurs. D'autre part, nous avons utilisé un biosenseur optique basé sur la SPR pour établir un test automatisé relativement simple permettant de déterminer les paramètres cinétiques d'une interaction analyte-ligand, en l'occurrence la liaison de BoNT/B sur des exosomes exprimant la SYT2 en

présence de gangliosides. Pour deux sources distinctes de BoNT/B, nous avons ainsi obtenu des constantes d'affinité (K_D) très proches de celles publiées en utilisant une source de récepteur native, comme les synaptosomes (Nishiki et al., 1996a). De manière intéressante, notre test révèle que la partie Hc/B possède une meilleure affinité que la BoNT/B entière pour la SYT2 et ce, principalement en raison d'une constante de dissociation très faible.

Enfin, la méthode que nous présentons repose sur la production de nano vésicules robustes et solubles présentant l'intérêt de pouvoir être étudiées avec de nombreux systèmes analytiques. De plus elle peut théoriquement s'appliquer à n'importe quel type de protéine membranaire.

4. Données annexes

Les résultats présentés dans cette partie constituent des données préliminaires ayant un lien direct avec les résultats figurant dans l'article. Certains de ces résultats devront être confirmés et/ou agrémentés d'expériences complémentaires avant leur publication.

a. Introduction

La protéine SV2 est le récepteur de la BoNT/A et de la BoNT/E dans les neurones. De par sa complexité structurale, la protéine SV2 qui comprend 12 segments transmembranaires putatifs, n'a jamais été produite entière de manière recombinante. Ainsi, en parallèle des cinq préparations d'exosomes exprimant CXCR4, Kv1.2, AMA1, SYT1 ou SYT2, décrites dans l'article 1, nous avons produit des exosomes exprimant la protéine SV2A.

b. Matériel et méthodes

La BoNT/A (souche Hall) provient de la firme Metabologics (Madison, VI) et correspond à la forme de neurotoxine en complexe avec les NAPs. Les anticorps polyclonaux anti-BoNT/A proviennent de Métabiologics. L'anticorps anti-SV2A provient de la firme Sigma (AV47093).

Les préparations d'exosomes exprimant la SV2A (exoSV2A) ont été réalisées dans les mêmes conditions que les préparations d'exosomes exprimant la SYT2 (exoSYT2) ou la SYT1 (exoSYT1), soit à partir de lignées cellulaire HEK 293 exprimant la protéine de façon stable.

Pour la préparation exoSV2A, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pCA-IZ contenant la séquence nucléotidique codant pour la séquence codant pour la SV2A humaine (SV2Ah ; NP_001315603.1). De plus, la séquence nucléotidique de la SV2A a été modifiée avec l'insertion d'un tag T7 (MASMTGGQMG) localisé entre les résidus Gly₂₀₂ et Ala₂₀₃, soit au niveau de la première boucle luminale/extracellulaire de la protéine SV2A.

c. Résultats

Expression exosomale de SV2A

En appliquant la méthodologie décrite dans l'article pour les préparations d'exosomes exoSYT2 et exoSYT1, nous avons produit des lignées stables pour l'expression de SV2A, puis purifié les fractions exosomales exoSV2A. Les protéines exprimées de manière exogène dans les exosomes ont été détectées par Western Blot (**Figure A1**). Le poids moléculaire observé pour la détection de SV2A, compris entre 100 et 130kDa est compatible avec le poids moléculaire attendu pour sa forme native glycosylée, dépassant son poids moléculaire théorique de 83kDa.

Détection de la liaison des BoNT/A sur les exoSV2A en ELISA

De façon analogue aux expériences de liaison conduites avec les exoSYT1 et exoSYT2 en ELISA, les exoSV2A ont été utilisés pour examiner leur capacité à lier la BoNT/A. De manière intéressante, la BoNT/A se lie de manière spécifique aux exoSV2A en présence mais aussi en absence de GT1b (**Figure A2**, résultats représentatifs, n=2 expériences indépendantes). En effet, le niveau de liaison spécifique (après déduction des signaux obtenus pour les exosomes témoins) détecté en absence de GT1b représente plus de 60% de celui observé en présence de GT1b.

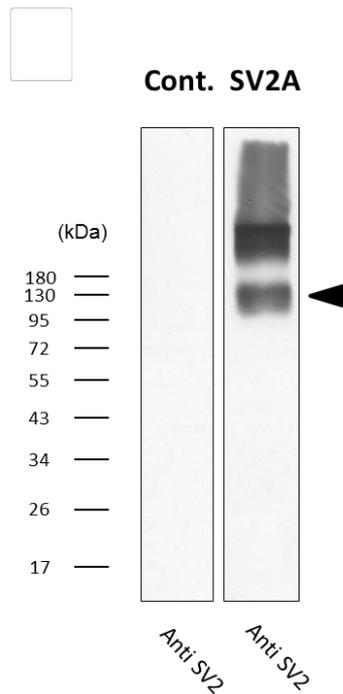


Figure A1 : Expression de SV2A dans des exosomes. A) Une préparation d'exosomes exprimant la SV2A a été analysée en Western Blot en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine SV2. La flèche indique le poids moléculaire attendu de la forme native de la protéine. Le signal au niveau de poids moléculaires plus élevés représente vraisemblablement des agrégats protéiques qui, à cause de la grande quantité de domaines transmembranaire de la SV2 ont des difficultés à rentrer dans la matrice du gel.

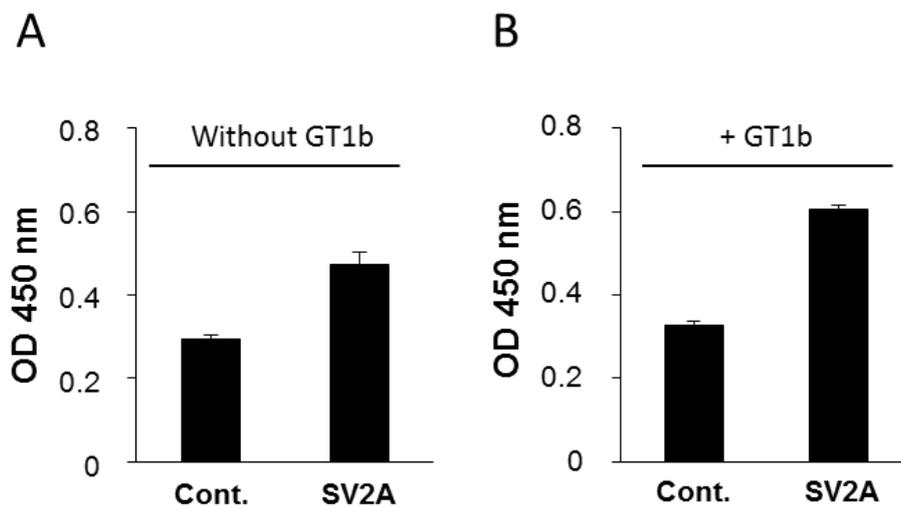


Figure A2 : Détection en ELISA de l'interaction de la BoNT/A avec les exoSV2A. A) Des exosomes exprimant la SV2A (SV2A) ou issus de cellules non transfectées (Cont.) ont été déposés directement sur microplaque puis chargés (B) ou non (A) avec du GT1b avant d'être incubés avec la BoNT/A (10nM). La liaison de la BoNT/A a été révélée via un anticorps anti-BoNT/A. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

d. Conclusion

Nous avons utilisé la même méthode que celle décrite dans l'article pour exprimer la protéine SV2 entière dans des exosomes. Cette protéine complexe a été détectée à un poids moléculaire compatible avec sa forme native et s'est révélée fonctionnelle dans un test de liaison avec la BoNT/A. Cependant, contrairement à la liaison de BoNT/B sur SYT qui dépend de la présence de gangliosides, nous avons observé que le GT1b n'est pas strictement requis mais montre un effet potentialisateur.

II. Article 2 : Le GT1b interagit avec le domaine extracellulaire de la synaptotagmine 2 formant ainsi un site de haute affinité pour la BoNT/B

[Article en préparation]

LE GT1B INTERAGIT AVEC LE DOMAINE EXTRACELLULAIRE DE LA SYNAPTOTAGMINE 2 FORMANT AINSI UN SITE DE HAUTE AFFINITE POUR LA NEUROTOXINE BOTULIQUE B

Richard Desplantes^{a,c}, Christian Lévêque^{a,c}, Jacques Fantini^f, Géraldine Ferracci^{b,c,*}, Yves Maulet^{a,c}, Marie-Pierre Blanchard^{b,c}, Baudoux Marion^{a,c}, Cécile Iborra^{a,c}, Mamoun Robert^e, Michel R. Popoff^d, Michael Seagar^{a,c}, and Oussama El Far^{a,c}

a. INSERM, UMR_S 1072, 13015 Marseille, France

b. CNRS, UMR 7286, Plate-Forme de Recherche en Neurosciences PFRN, 13015 Marseille, France

c. Aix-Marseille Université, 13015 Marseille, France

d. CNR Bactéries Anaérobies et botulisme, Unité Bactéries anaérobies et toxines. Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

e. Ciloa, cc90-Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, 34095, Montpellier Cedex5, France.

f. Aix-Marseille Université, PPSN-EA4674, Faculté des Sciences, 13013 Marseille, France.

RESUME

La neurotoxine botulique de type B (BoNT/B) fait partie des molécules les plus toxiques pour l'homme provoquant une paralysie flasque potentiellement mortelle. Nous avons mesuré dans un contexte membranaire, l'interaction de la BoNT/B avec chacun des deux récepteurs décrits : le ganglioside GT1b et la synaptotagmine 2 (SYT2), une protéine des vésicules synaptiques. Alors que la BoNT/B se lie seulement à forte concentration et de façon rapidement réversible sur le GT1b, elle possède une affinité de 40 nM pour la SYT2 exprimée à la surface d'exosomes. La présence de GT1b dans les membranes d'exosomes exprimant la SYT2 induit une augmentation d'affinité d'un facteur 65, essentiellement par un accroissement de la constante cinétique d'association. Nos données expérimentales renforcées par une modélisation moléculaire démontrent que le domaine juxtamembranaire extracellulaire de la SYT2 lie directement la tête polaire du GT1b avec une affinité de 3 μ M. La première lysine du domaine extracellulaire (K60) de la SYT2 localisée en dehors du site

d'interaction BoNT/B-SYT2, est impliquée dans l'interaction avec le GT1b et sa mutation réduit la liaison de la BoNT/B sur le complexe SYT2-GT1b. Nous proposons un modèle de reconnaissance des terminaisons synaptiques par la BoNT/B, dans lequel l'interaction SYT/GT1b représenterait une première étape clef dans la séquence d'évènements conduisant à l'intoxication du neurone.

INTRODUCTION

Les neurotoxines botuliques de type A, B et E (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E), sont les principaux serotypes impliqués dans le botulisme humain, qui se traduit par une paralysie de type flasque. Les neurotoxines botuliques (BoNTs) atteignent leurs cibles intracellulaires après liaison et internalisation par des membranes neuronales. Les BoNTs se fixent sur des récepteurs localisés dans les terminaisons cholinergiques du système nerveux périphérique, en particulier au niveau des jonctions neuromusculaires où elles bloquent la neurotransmission.

D'un point de vue moléculaire, les BoNTs sont composées de deux polypeptides, la chaîne lourde (HC, 100 kDa) et la chaîne légère (LC, 50 kDa), liées par un pont disulfure et des interactions non covalentes (Rossetto et al., 2013). Toutes les neurotoxines botuliques utilisent des mécanismes similaires d'intoxication. La chaîne lourde, structurée en deux domaines distincts, est le véhicule d'adressage de la neurotoxine. La partie carboxy-terminale de la chaîne lourde (H_{CC}) est impliquée dans la liaison au récepteur, alors qu'après internalisation vésiculaire, le domaine amino-terminal (H_N) permet la translocation cytoplasmique de la LC, au travers de la membrane de la vésicule synaptique (VS). La chaîne légère des BoNTs est une endopeptidase dépendante du zinc, provoquant la paralysie musculaire par inactivation protéolytique de protéines neuronales indispensables pour la libération de neurotransmetteurs. La BoNT/B clive la synaptobrevine (VAMP2), une protéine de la membrane des vésicules synaptiques, alors que la BoNT/A et la BoNT/E clivent la SNAP25 (Synaptosomal-Associated Protein of 25kDa), qui est localisée sur le feuillet interne de la membrane pré-synaptique.

Des études moléculaires et cellulaires ont démontré que des gangliosides et des domaines intraluminaux de protéines des vésicules synaptiques constituent les récepteurs membranaires des BoNTs. Ces récepteurs protéiques deviennent accessibles au milieu

extracellulaire après fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Les BoNT/A et E lient la protéine SV2 alors que la BoNT/B utilise les isoformes 1 et 2 de la synaptotagmine (SYT) (Rummel, 2015).

Les gangliosides GT1b et GD1a sont essentiels pour l'entrée de la BoNT/B dans les neurones (Dong et al., 2007). Ces glycosphingolipides sont des molécules amphipathiques, résidant dans le feuillet externe de la membrane plasmique. La partie céramide s'insère dans la membrane plasmique alors que le domaine oligosaccharidique hydrophile, qui contient 2 (GD1a) ou 3 (GT1b) résidus d'acides sialiques, est exposé vers le milieu extra-cellulaire. Les gangliosides sont particulièrement abondants dans les neurones où ils représentent 10 à 20% des lipides du feuillet externe de la membrane plasmique (Ledeen, 1984). Ils sont concentrés dans les terminaisons nerveuses où le GT1b est le plus représenté (Sonnino et al., 2010).

SYT1 et SYT2 sont exprimés dans les vésicules synaptiques. Ces deux protéines possèdent une partie extracellulaire N-terminale courte à la fois N- et O-glycosylée (Perin et al., 1991; Fukuda, 2002; Han et al., 2004), un segment transmembranaire et une partie intracytoplasmique contenant 2 domaines C2 qui fonctionnent comme senseur de calcium dans l'exocytose de type rapide (Harris and Littleton, 2015). Ce domaine cytoplasmique joue aussi un rôle dans la régulation de la vitesse d'endocytose des vésicules synaptiques (Diril et al., 2006). Les SYT ont la capacité de former des oligomères (Brose et al., 1992) et d'interagir avec la SV2 (Schivell et al., 2005).

L'affinité de la BoNT/B déterminée sur des préparations subcellulaires de cerveau de rat est d'environ 1 nM ($K_D = 0.2 - 4$ nM) (Evans et al., 1986; Nishiki et al., 1996a; Bakry et al., 1997). Plusieurs études démontrent que SYT1/2 et les gangliosides sont indispensables pour la formation de ce site de haute affinité (Bullens et al., 2002; Yowler, 2002; Dong et al., 2003, 2007). La différence d'affinité de la BoNT/B pour la SYT1 versus la SYT2, mesurée sur des systèmes reconstitués en présence de GT1b, varie d'un facteur 10 en faveur de SYT2 qui est l'isoforme majoritaire à la jonction neuromusculaire (Pang et al. 2006).

Des études cristallographiques ont corroboré l'hypothèse que la BoNT/B reconnaît un double récepteur, en révélant deux poches distinctes dans le domaine H_{CC} de la BoNT/B, l'un pour la SYT2 et l'autre pour le ganglioside (Berntsson et al., 2013). La partie N-terminale extracellulaire juxta-membranaire de la SYT2 (Phe₄₇ à Ile₅₈ pour la SYT2) se lie dans une

gorge hydrophobe de la région H_{CC} de la BoNT/B. Le domaine de liaison de la SYT2, qui n'est pas structuré en solution, forme une hélice α amphipathique, interagissant avec plusieurs acides aminés de la face hydrophobe de la BoNT/B (Jin et al., 2006). Les deux sites d'ancrage pour la SYT2 et le GD1a sont proches mais indépendants, distants d'environ 15Å (Berntsson et al., 2013). De façon notable, les études structurales indiquent que la BoNT/B ne change pas de conformation lors de la liaison aux récepteurs, suggérant que la structure H_{CC} est rigide et qu'il n'existe pas de coopération allostérique pour la fixation sur les récepteurs (Jin et al., 2006).

Le GT1b potentialise *in vitro* la liaison de la BoNT/B sur la SYT2 dans des micelles de détergent, cependant cet effet n'a pas été quantifié (Dong et al., 2003). De façon surprenante, alors que la BoNT/B peut lier un peptide N-terminal de la SYT ou la SYT recombinante purifiés en détergent en absence de GT1b, aucune donnée ne montre à ce jour une liaison de la BoNT/B sur la SYT dans un contexte membranaire. De même, aucune donnée expérimentale ne démontre l'interaction de la BoNT/B avec le GT1b inséré dans une membrane.

La séquence d'évènements aboutissant à la liaison de la BoNT/B sur les terminaisons synaptiques n'est pas complètement élucidée. L'hypothèse la plus courante est que la BoNT/B circulante se lierait premièrement sur le GT1b qui est abondant dans les terminaisons nerveuses. Le complexe GT1b-BoNT/B migrerait ensuite dans le plan de la membrane, facilitant la rencontre avec le récepteur protéique, pour former un complexe protéine-BoNT-GT1b de haute affinité qui serait alors endocyté (Montecucco, 1986; Montecucco et al., 2004). Une hypothèse alternative, non-étayée, émise il y a près de 20 ans par le groupe de S. Kozaki, propose que la BoNT/B se lie directement à un co-récepteur préalablement associé via une interaction entre le domaine transmembranaire de la SYT et la partie céramide du GT1b (Kozaki et al., 1998).

Dans cette étude nous avons mesuré dans un contexte membranaire l'interaction de la BoNT/B avec d'une part le GT1b et d'autre part la SYT2. Nous avons par ailleurs déterminé que la SYT et le GT1b interagissent directement via la partie oligosaccharidique du GT1b et un domaine juxtamembranaire extracellulaire de la SYT2. Nos données suggèrent que la BoNT/B lie un co-récepteur préalablement assemblé dans les terminaisons synaptiques.

MATERIELS ET METHODES

Réactifs

La BoNT/B, BoNT/A, BoNT/E (holotoxines), BoNT/B en complexe et la H_{CC}/B ont été obtenues comme décrit précédemment (Desplantes et al., 2017). Les séquences complètes de synaptotagmine de rat isoformes 1 et 2 couplées à la GST (GST SYT1 et GST SYT2) ont été exprimées chez *E. coli* et purifiées dans un tampon contenant 20 mM Tris/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, Triton X-100 0.1% sur une résine glutathion selon un protocole standard. Les peptides correspondant aux séquences de la SYT2 de rat 40-66 et 49-60 ont été synthétisés par Genecust. Le peptide 40-66 comprend une biotine à l'extrémité N-terminale. L'anticorps polyclonal de lapin anti BoNT/B a été obtenu chez Métabiologics alors que l'anticorps anti-BoNT/B neutralisant provient du laboratoire de M. Popoff. L'anticorps anti-GT1b provient de la firme Millipore, et l'anticorps anti-CD81 provient d'AbCam. Les anticorps anti SYT2 (8G2b et 5B7a) ont été obtenus comme décrit précédemment (Desplantes et al., 2017). La phosphatidyl choline (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et le cholestérol ont été obtenus auprès d'Avanti Polar.

Préparation des exosomes :

Les exosomes ont été produits et purifiés comme décrit précédemment (Desplantes et al., 2017) à partir de cellules HEK obtenues auprès de la banque de cellules ATCC.

Préparation des liposomes :

Les liposomes de phosphatidylcholine ont été préparés par extrusion sur des filtres de 100 nm comme décrit (de Haro et al., 2004).

Préparation des peptidoliposomes et protéoliposomes :

Le peptide (1.3 nmole) a été desséché sous vide avec une solution de lipides (850 nmoles) contenant du cholestérol 30%, du POPC 70% et de la phosphatidyl ethanolamine biotinylée comme traceur. Les films lipidiques ont été dissous dans un tampon HBS contenant du Triton X-100 1% et reconstitués en utilisant la méthode (Rigaud and Lévy, 2003) par absorption du détergent sur une résine SM2 (Biorad). Pour les GST-SYT les protéines de fusion ont été ajoutées aux lipides solubilisés en Triton (rapport molaire GST-SYT/GT1b = 0,2) avant d'être reconstituées dans les liposomes.

ELISA (exosomes) :

Les tests de liaison de la BoNT/B ont été effectués avec des exosomes de cellules HEK293T non transfectées (exocontrôles) ou transfectés de façon stable avec la SYT2 de rat (exoSYT2) et capturés dans des plaques 96 puits Nunc Maxisorp selon le protocole précédemment décrit (Desplantes et al., 2017).

ELISA (cellules PC12):

Tous les puits des plaques de culture ont été préincubés avec de la poly-L-Lysine (10 µg/ml, Sigma). Des cellules PC12 déficiente pour la SYT1 ($\Delta SYT1PC12$, Shoji-kasai 1992) ont été cultivées dans un milieu de culture complet (DMEM supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal, 5% sérum de cheval et 1% pénicilline/streptomycine). Pour certaines expériences, une partie des cellules en cultures a été prétraitée pendant 48 heures avec du DL-*threo*-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol (PPMP), un inhibiteur de la glucosyl-céramide synthase, à 7,5 µM. Pour les tests cellulaires révélés en colorimétrie, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 24 puits (300 000 cellules/puits). Pour les expériences d'immunocytochimie, les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de 18 mm prétraitées avec de la Poly-L-Lysine dans des plaques à 12 puits (500 000 cellules/puits). Les cellules ont été transfectées soit avec le plasmide témoin pIRES2-EGFP (Clontech) soit avec un plasmide pIRES2-EGFP exprimant la SYT2 en utilisant de la Lipofectamin® 2000 selon le protocole du fournisseur. Après 5 heures, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture complet avec ou sans ajout de PPMP et l'expression par les cellules poursuivie pendant 40 heures.

Immunocytochimie :

Après 40 heures d'expression, les cellules prétraitées ou non avec le PPMP ont été incubées ou non, avec du GT1b (10 µM) pendant 2 heures à 37°C. Après lavage, un mélange de BoNT/B (5 nM) et d'anticorps 8G2b anti-SYT2 (1 µg/ml) a été ajouté dans le milieu de culture complet durant 1 heure à 37°C. Pour certaines expériences visant à limiter drastiquement les phénomènes dynamiques des membranes, les plaques ont été refroidies et la double incubation de BoNT/B et d'anticorps anti-SYT2 a été réalisé dans un milieu complet froid, pendant 1 heure à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS (PBS froid pour les incubations réalisées à 4°C) et fixées pendant 30 minutes à température

ambiante en utilisant un tampon de fixation (PBS avec 4% paraformaldehyde). Les cellules ont ensuite été lavées avec un tampon de chlorure d'ammonium (20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 80 mM Na_2HPO_4 pH 7,4, 50 mM NH_4Cl) et les sites de liaison non spécifiques bloqués avec un tampon de blocage (20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 80 mM Na_2HPO_4 pH 7,4, 0,2% gélatine, 0,056% saponine) durant 45 minutes à température ambiante. Un anticorps de lapin anti-BoNT/B (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a ensuite été ajouté durant 1 heure à température ambiante. Puis, après lavage une seconde incubation d'anticorps caprins a été réalisée avec un mélange d'anti-lapin Alexa 555 et d'anti-souris Alexa 647. Les lamelles ont été lavées, montées (milieu de montage Dako) et stockées à 4°C avant d'être analysées en microscopie.

Microscopie et analyses quantitatives :

L'imagerie a été réalisée au microscope confocal (Zeiss LSM780) en utilisant un objectif 63X (NA 1.4) à immersion d'huile. Des séries de coupes optiques (z-stacks) ont été faites à travers les échantillons. La fluorescence associée aux différents marquages est collectée par acquisitions séquentielles des longueurs d'ondes correspondantes. Les images présentées sont des coupes optiques individuelles. L'analyse d'images a été réalisée avec le logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Les cellules exprimant la SYT2 ont été identifiées par la fluorescence de la GFP après excitation à 488 nm. Afin d'évaluer la liaison de la BoNT/B, les intensités de fluorescence ont été mesurées en appliquant à toutes les images un seuillage identique aussi bien dans les expériences contrôles que pour les conditions traitées au PPMP. Les effets du PPMP sur la liaison de la BoNT/B sur ses récepteurs ont été exprimés en valeurs relatives obtenues par le ratio des intensités de fluorescence mesurées dans des conditions de traitement au PPMP sur la valeur moyenne de fluorescence des cellules non traitées. L'effet du traitement au PPMP sur la détection de GT1b a été réalisé de la même façon. Les barres des diagrammes indiquent des moyennes de valeurs \pm SEM (erreur standard de la moyenne). Un test « one-way » ANOVA a été utilisée pour l'analyse statistique des données.

Test colorimétrique sur cellules PC12 :

Après 40 heures d'expression, les cellules ont été pré-incubées ou non avec 10 μM de GT1b durant 2 heures. Les plaques de cellules PC12 ont ensuite été refroidies pendant 10 min sur la glace puis les cellules incubées pour 1 heure supplémentaire dans un milieu de culture complet froid contenant 5 nM de BoNT/B (MétabioLogics) en présence ou absence d'anticorps neutralisant anti-BoNT/B (100 nM). Après des lavages avec du PBS froid, les cellules ont été fixées pendant 30 minutes à température ambiante en utilisant un tampon de fixation (PBS avec 4% paraformaldehyde). Les cellules ont ensuite été lavées avec un tampon de chlorure d'ammonium (20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 80 mM Na_2HPO_4 pH 7,4, 50 mM NH_4Cl) et les sites de liaison non spécifiques bloqués avec un tampon de blocage (20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 80 mM Na_2HPO_4 pH 7,4, 0,2% gélatine, 0,056% saponine) durant 45 minutes à température ambiante. Des anticorps anti-BoNT/B (MétabioLogics) ont ensuite été ajoutés dans le tampon de blocage (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pour une incubation d'une heure. Les puits ont été lavés et des anticorps caprins anti-lapin couplé à l'HRP et dilué dans le tampon de blocage (1/30 000) ont été ajoutés pour une nouvelle incubation d'1 heure à température ambiante. Après lavage, un substrat de la peroxydase, le TMB (Uptima) a été ajoutée pour révéler l'activité de cette dernière. La réaction de coloration a été stoppée par l'ajout de H_2SO_4 (0,5 M) et la densité optique mesurée à 450 nm.

Résonance plasmonique de surface (SPR) :

Les expériences de SPR ont été réalisées à 25°C en utilisant comme appareil le Biacore 3000 ou le Biacore T200 (GE Healthcare) avec un tampon de course HBS (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl) avec des puces de biosenseurs de type CM3 (Biacore), 2D carboxymethyl-dextran surface CMDP (Xantec) sans dextran ou des sensors chip L1. Certaines expériences ont été réalisées avec un tampon à plus haute force ionique (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 340 mM NaCl). Les puces de biosenseurs ont été préparées par le couplage covalent d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CD81 pour capturer des exosomes contrôles ou la SYT2 (5B7a) pour capturer des exosomes SYT2 comme précédemment décrit (Desplantes et al., 2017). Les exosomes ont été injectés à un flux de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ de façon à obtenir une masse capturée d'environ 1500-2000 RU. Les exosomes supplémentés en GT1b (exoGT1b) ont été obtenus en injectant du GT1b (1 μM) sur les exosomes contrôles pour capturer environ 100-200 RU de GT1b. La méthode « single-cycle

kinetic » a été utilisée pour calculer les affinités de la BoNT/B sur les exo SYT2 nécessitant l'injection de 5 concentrations croissantes comprise entre 10 et 164 nM pour les exo SYT2. Une gamme de concentration de BoNT/B comprise entre 25 et 400 nM a été injectée sur les exoGT1b. Les signaux obtenus sur les pistes contrôles (exocontrôle) ont été automatiquement soustraits des signaux obtenus sur la piste expérimentale (exoGT1b ou exoSYT2). Les données ont été analysées avec le logiciel BiAevaluation 2.0 du Biacore T200 2.0 ou 4.1 du Biacore 3000.

L'interaction et l'affinité des peptides SYT2 pour le GT1b a été mesurée sur des liposomes phosphatidylcholine/cholestérol (70/30) immobilisés sur une sensor chip hydrophobe L1 supplémentés avec du GT1b. Des liposomes sans GT1b ont été utilisés comme piste contrôle. L'affinité du peptide SYT2 (40-66) a été mesurée à l'équilibre.

SPR peptidoliposomes :

Les peptidoliposomes filtrés sur 0.2 μm ont été capturés (4000 RU) sur une sensor chip CMDP fonctionnalisée avec de la neutravidine. Le GT1b (500 RU) a été injecté ou pas pour obtenir des peptidoliposomes avec GT1b qui ont été testés en parallèle avec des peptidoliposomes non supplémentés pour l'interaction de la BoNT/B holotoxine injectée à 2 nM.

Modélisation moléculaire :

Les analyses in silico ont été réalisées à l'aide des logiciels Hyperchem et Molegro Molecular Viewer (Methods Mol Biol. 2017;1583:7-19.). Les conditions initiales de GT1b et de SYT2 correspondent à des structures minimisées obtenues par l'algorithme de Polak-Ribière. Les complexes SYT2-GT1b sont d'abord obtenus par docking moléculaire, puis soumises à des cycles itératifs de dynamique moléculaire (champ de force CHARMM). L'énergie d'interaction de chaque complexe a été déterminée avec la fonction « Ligand Energy Inspector » du logiciel Molegro jusqu'à obtention d'un complexe stable sur plusieurs cycles de 10 ns.

RESULTATS

Mesure de liaison de la BoNT/B sur le GT1b dans un environnement membranaire

La liaison de la BoNT/B sur le GT1b a premièrement été mesurée en utilisant des vésicules extracellulaires de type exosome (exo), purifiées à partir de surnageant de culture de cellules HEK. Ces vésicules lipidiques qui ne contiennent pas de GT1b ont été capturées dans des puits de microplaques, avant d'être supplémentées (exo/GT1b) ou non (exo) avec du GT1b (Desplantes et al., 2017) puis incubées avec la BoNT/B. Aucune liaison spécifique n'a été observée entre la BoNT/B et le GT1b (**Fig. 1A**, test Mann-Whitney $p > 0.05$) inséré dans des exosomes.

Afin de corroborer l'absence d'interaction de la BoNT/B avec le GT1b dans un contexte membranaire, nous avons cherché à détecter par immunofluorescence la liaison de la BoNT/B sur des cultures cellulaires en absence de SYT. Pour cela, nous avons utilisé une lignée cellulaire neuroendocrine PC12 qui exprime des gangliosides de la série b dont le GT1b mais pas le GD1a (Walton et al., 1988), et qui n'exprime pas la SYT1 (PC12 Δ SYT1). Une condition contrôle a consisté à traiter ces cellules avec un inhibiteur de synthèse des gangliosides (PPMP) de façon à pouvoir comparer la liaison de la BoNT/B en présence et absence de GT1b. Le traitement par le PPMP induit une diminution drastique (98 +/- 2%, n=3 expériences indépendantes) du niveau d'expression du GT1b dans les cellules (**Fig. 1 B et 1C**). La Fig 1B (gauche) montre que la BoNT/B ne se lie pas sur les PC12 Δ SYT1, avec un marquage non spécifique faible et équivalent à celui obtenu avec des cellules traitées avec le PPMP. Pour s'assurer que l'absence de liaison de la BoNT/B sur le GT1b n'était pas due à une expression endogène trop basse de GT1b, les cellules PC12 ont été incubées avec du GT1b exogène avant l'étape de liaison avec la BoNT/B. Cependant, même en présence de GT1b exogène incorporé dans les membranes cellulaires (**Fig. 1C**), la liaison de BoNT/B n'est pas détectée sur les cellules PC12 (**Fig. 1B**). Ces résultats démontrent que la liaison de la BoNT/B sur du GT1b endogène ou exogène associé à des membranes n'est pas détectable par ELISA ou par immunocytochimie.

Nous avons utilisé la SPR, qui permet de mesurer des interactions moléculaires de faible affinité et/ou à cinétiques rapides, afin de détecter une interaction entre la BoNT/B et le GT1b inséré dans des exosomes (exo/GT1b). Nous avons utilisé la SPR, une technique permettant de mesurer des interactions moléculaires de faible affinité, afin de détecter

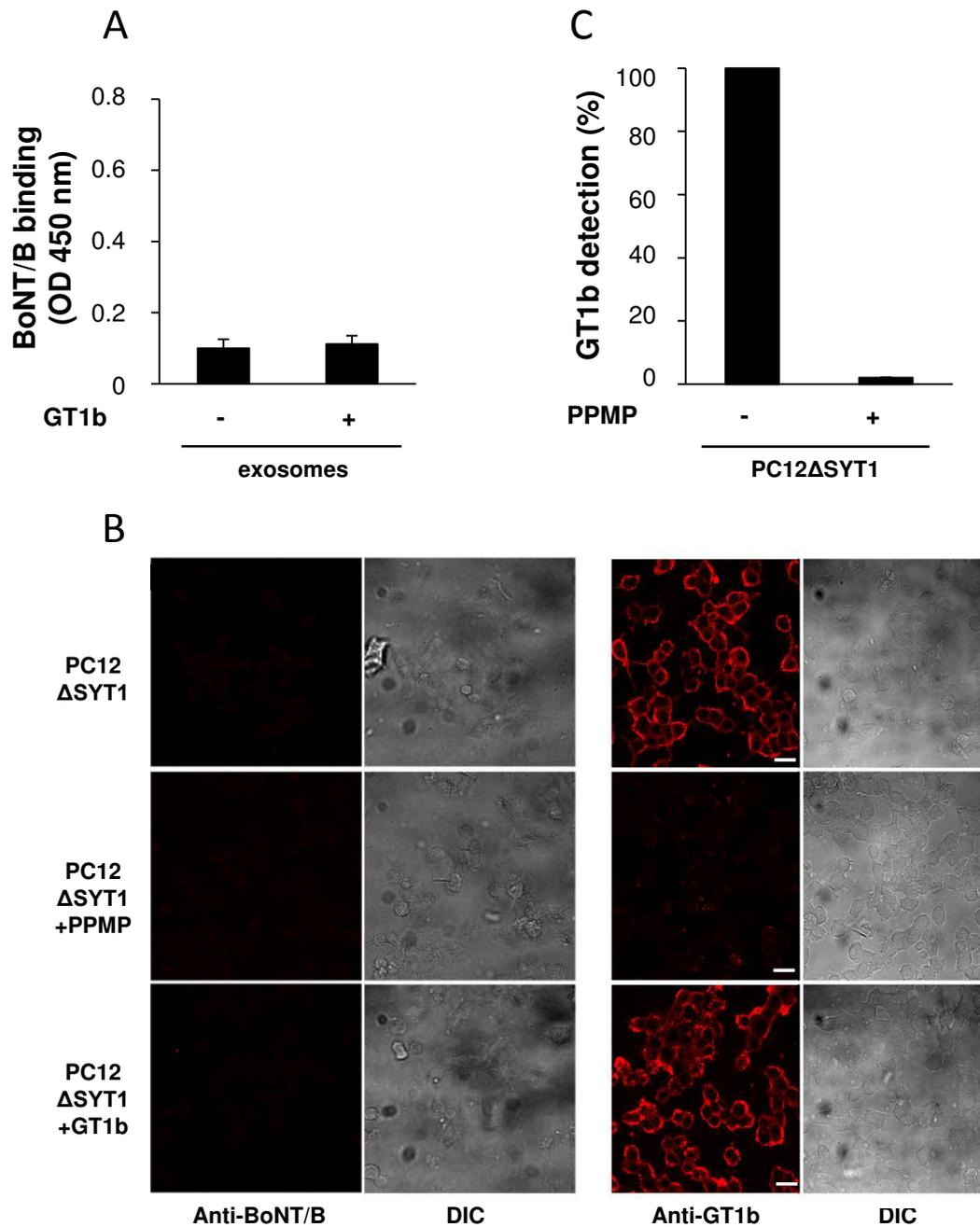


Figure 1: Absence de liaison de la BoNT/B sur du GT1b inséré dans des membranes (A) BoNT/B (10 nM) est incubée avec des exosomes supplémentés ou non avec du GT1b (barres d'erreur = SD de la moyenne de 5 expériences indépendantes). (B) Colonne de gauche (Anti-BoNT/B) : Détection en immunofluorescence de l'interaction de la BoNT/B (5 nM) avec des cellules PC12 n'exprimant pas la SYT1 (PC12ΔSYT1), traitées ou non avec le PPMP (PC12ΔSYT1+PPMP) ou supplémentées avec du GT1b exogène (PC12ΔSYT1+GT1b). Colonne de droite (Anti-GT1b) : Détection en immunofluorescence du GT1b à l'aide d'un anticorps anti-GT1b sur les cellules PC12 (barre d'échelle = 15 μm). Les images de cellules en contraste de phase (DIC) correspondant aux conditions de marquage de la BoNT/B et du GT1b sont affichées respectivement dans la seconde et quatrième colonne. (C) Quantification du marquage du GT1b sur les cellules PC12ΔSYT1 traitées ou non avec le PPMP (3 expériences indépendantes, 2010 cellules contrôles, 2012 cellules traitées, les barres d'erreur ne sont pas visibles).

une interaction entre la BoNT/B et le GT1b inséré dans des exosomes (exo/GT1b). Pour une concentration de 30 nM de BoNT/B nous avons observé une très faible liaison, proche de la limite de de détection du biocapteur, avec une dissociation rapide lors de l'étape de lavage (**Fig. 2A**). En revanche, dans les mêmes conditions la BoNT/C, connue pour lier efficacement le GT1b via deux sites d'interaction (Karalewitz et al., 2012), montre une liaison plus forte sur les exo/GT1b avec une dissociation lente durant la phase de lavage. En injectant une gamme de concentration croissante de BoNT/B, nous avons pu observer que celle-ci s'associe au GT1b de manière concentration-dépendante et dissocie rapidement après la phase d'association (**Fig. 2B**). Il n'est pas possible d'obtenir un bon ajustement entre les sensorgrammes expérimentaux (tracé noir) et un modèle à une étape d'interaction 1:1 (tracé rouge), ce qui laisse suspecter la présence de plusieurs équilibres simultanés et/ou successifs. Des ajustements plus fidèles sont obtenus avec un modèle incluant deux équilibres liés (résultats non montrés). Ce type de modèle a permis de proposer que l'interaction entre la BoNT/A et et le GT1b inclut un changement de conformation (Yowler and Schengrund, 2004). Cependant ce modèle n'est pas applicable à la BoNT/B car cette dernière ne change pas de conformation en présence de GT1b à pH physiologique (Stenmark et al., 2008; Sun et al., 2011; Berntsson et al., 2013). Ces résultats indiquent que la BoNT/B interagit avec le GT1b de manière rapide et complexe avec une faible affinité.

Mesure de liaison de la BoNT/B sur la SYT2 membranaire en absence de GT1b

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence une interaction de la BoNT/B avec la SYT2 en absence de GT1b et dans un contexte membranaire. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire PC12 Δ SYT1 que nous avons transfectée avec un plasmide exprimant la SYT2 (PC12 Δ SYT1 SYT2⁺) et traitée avec du PPMP afin d'inhiber la synthèse des gangliosides. En exploitant le fait que des anticorps dirigés contre la SYT2 peuvent se lier à l'extrémité N-terminale de la protéine sans affecter la liaison de la BoNT/B (Dong et al., 2003), les cellules PC12 ont été incubées simultanément avec la BoNT/B et un anticorps monoclonal anti-SYT2. Après lavages, fixation et incubation avec un anticorps anti-BoNT/B, la présence de SYT et de BoNT/B associée aux cellules a été révélée par immunofluorescence.

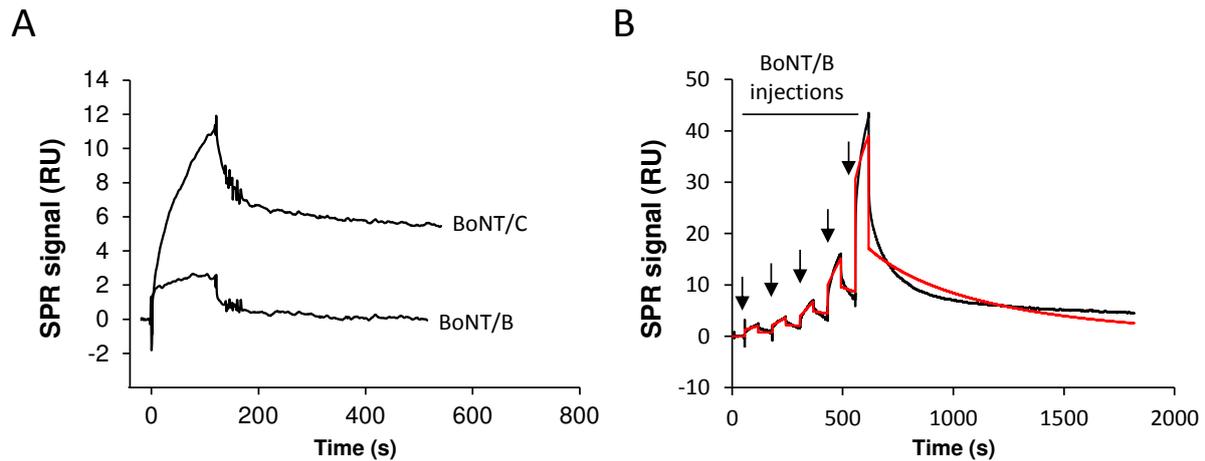
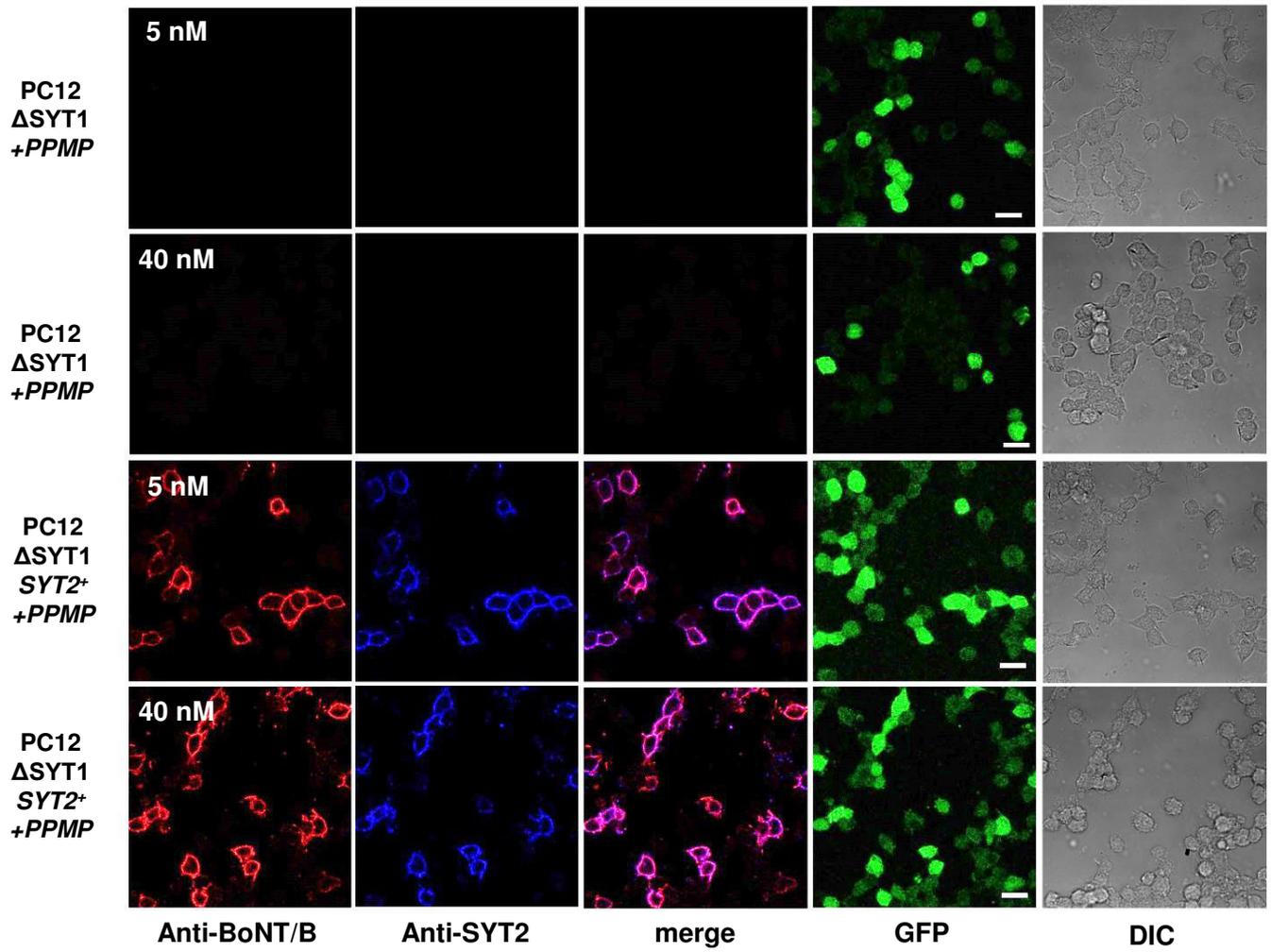


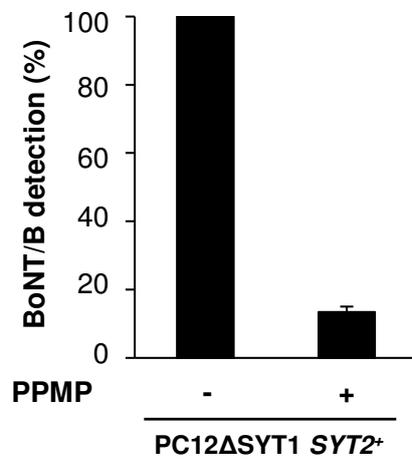
Figure 2 : Mesure de la liaison de la BoNT/B sur des exosomes contenant du GT1b en SPR. **(A)** La BoNT/B (30 nM) et la BoNT/C (30 nM) ont été injectées sur des exosomes non recombinants immobilisés sur une sensor chip, puis supplémentés ou non avec du GT1b (exo/GT1b). Les sensorgrammes montrent le signal spécifique obtenu pour chacune des toxines sur les exo/GT1b. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes. **(B)** Sensorgramme (tracé noir) illustrant les profils d'interaction sur des exoGT1b résultant de l'injection d'une gamme de concentration de BoNT/B (25, 50, 100, 200 et 400 nM; flèches). Le tracé rouge représente une simulation suivant un modèle d'interaction 1 : 1.

En absence de PPMP, un marquage ponctiforme pour la SYT2 et la BoNT/B a été essentiellement détecté à la surface des cellules avec un degré de colocalisation très important (**Fig. S1**). De plus, il y a très peu de marquage intra-cellulaire, ce qui est cohérent avec la faible dynamique d'internalisation de ces cellules qui a été décrite dans des conditions non dépolarisantes (Dong et al., 2003). Lorsque les cellules PC12 Δ SYT1 SYT2⁺ sont traitées avec le PPMP, nous observons un marquage avec la BoNT/B (5 nM) (**Fig. 3A, troisième ligne**). Ce marquage représente 13% du marquage observée en absence de PPMP (**Fig. 3B**). Par ailleurs, il est amplifié d'un facteur 3 lorsque la concentration de BoNT/B est augmentée à 40 nM (**Fig. 3C**), alors que le marquage non spécifique reste très faible (**Fig. 3A, deuxième ligne**). Ces résultats indiquent que la BoNT/B peut se lier, dès 5 nM, à la SYT2 exprimée dans une membrane cellulaire en absence de GT1b, et montrent que le nombre de sites récepteurs pour la BoNT/B est fortement diminué en l'absence de GT1b.

A



B



C

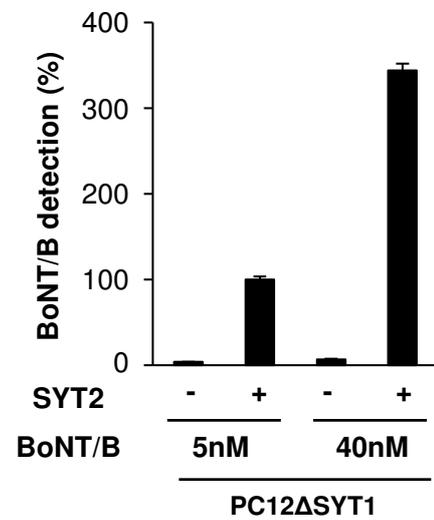


Figure 3: Détection en immunofluorescence de l'interaction de la BoNT/B à 5 nM et 40 nM sur les cellules PC12 Δ SYT1 en absence de GT1b. (A) Colonne de gauche (Anti-BoNT/B): détection de la liaison de la BoNT/B incubée à 5 nM (première et troisième ligne) ou à 40 nM (deuxième et quatrième ligne) sur des cellules exprimant (PC12 Δ SYT1 SYT2⁺) ou non (PC12 Δ SYT1) la SYT2 et traitées avec le PPMP. Colonnes centrales (Anti-SYT2, merge): détection de la SYT2 exprimée (Anti-SYT2) et fusion des signaux avec la BoNT/B détectée (merge). Colonne de droite (GFP): détection de la GFP, témoin de la transfection. Aucune liaison de BoNT/B n'est détectée pour les cellules n'exprimant pas la SYT2 (PC12 Δ SYT1). Les images de cellules en contraste de phase correspondant aux différentes conditions sont affichées dans la colonne de droite (DIC). (B) Mesure de la liaison de la BoNT/B (5 nM) sur des cellules PC12 Δ SYT1 SYT2⁺ traitées ou non avec le PPMP (3 expériences indépendantes, 132 cellules contrôles, 108 cellules traitées). (C) Comparaison du marquage de la BoNT/B à 5 et 40 nM sur des cellules PC12 Δ SYT1 transfectées ou non avec la SYT2 et traitées avec le PPMP (2 expériences indépendantes, 60 cellules incubées avec la BoNT/B à 5 nM et 79 cellules incubées avec la BoNT/B à 40 nM). Les niveaux de détection de liaison de la BoNT/B sur les cellules PC12 ont été normalisés en fonction du marquage de la SYT2.

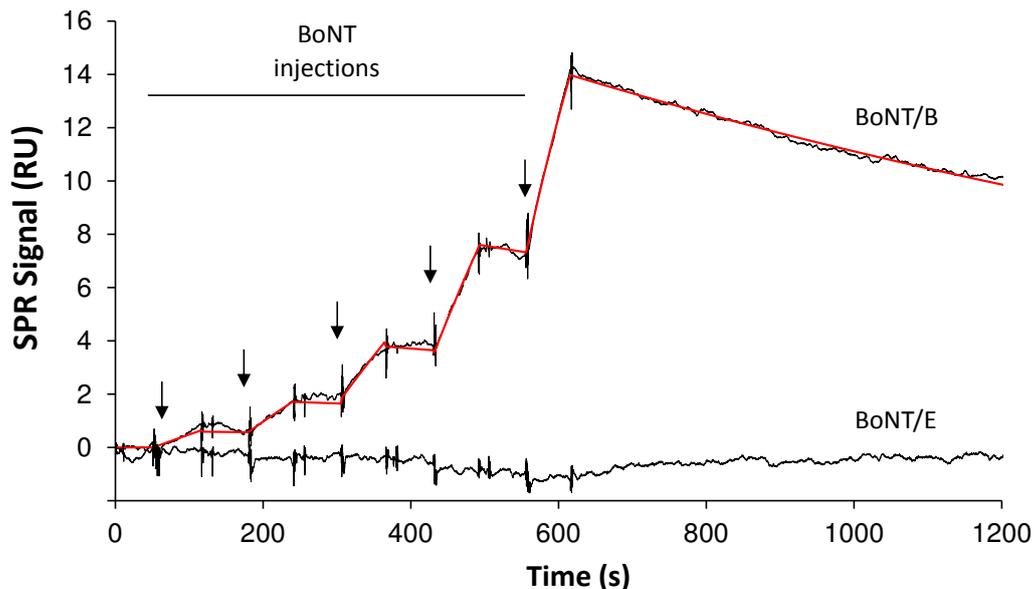


Figure 4 : Détermination de l'affinité de la BoNT/B sur des exoSYT2. La BoNT/B (tracé du haut) ou la BoNT/E (tracé du bas) ont été injectées (flèches noires) à des concentrations croissantes (10, 20, 40, 80 et 160 nM) sur des exoSYT2 et des exosomes contrôle n'exprimant pas la SYT2 (exocontrol). Les signaux obtenus avec les exocontrol ont été automatiquement soustraits aux signaux obtenus avec les exoSYT2 et seuls les signaux spécifiques sont ici présentés. Les lignes noires correspondent aux mesures expérimentales alors que la ligne rouge représente une simulation avec un modèle d'interaction 1:1. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Afin de déterminer l'affinité de la BoNT/B pour la SYT2 en SPR dans un contexte membranaire nous avons utilisé des exosomes exprimant SYT2 (exoSYT2). Les exoSYT2 ont été capturés sur des sensorchips et l'affinité de la BoNT/B déterminée selon la méthode du « single cycle kinetics » (**Fig. 4**). L'interaction avec la BoNT/B-exoSYT2 montre un K_D de 39 ± 5 nM ($k_{on} = 1.5 \times 10^4 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 5.6 \times 10^{-4} \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$, $n = 6$ expériences indépendantes) (**Fig. 4**; **Tableau 1**). Les mesures d'affinité sur exoSYT2 en présence ou absence de GT1b montrent que l'absence de GT1b provoque une importante diminution d'affinité pour la BoNT/B par rapport à des conditions où les exosomes sont chargés avec du GT1b (**Tableau 1**), soit une baisse d'un facteur 65. La constante cinétique d'association (k_{on}) est diminuée d'un facteur 15 alors que la constante cinétique de dissociation (k_{off}) augmentée d'un facteur 4 par rapport à une condition où les exoSYT2 sont supplémentés avec le GT1b ($K_{D(GT1b)} = 65 \times K_D$; $k_{on(GT1b)} = 15 \times k_{on}$; $k_{off(GT1b)} = 0,25 \times k_{off}$) (**Tableau 1**).

Alors que le domaine H_{CC} de la BoNT/B (H_{CC}/B) se lie de manière irréversible sur des exosomes SYT2/GT1b (**Desplantes 2017**), le binding de la H_{CC}/B est réversible sur des exoSYT2 en absence de GT1b avec une affinité de 3.9 ± 1.9 nM (**Tableau 1**). Nous avons aussi confirmé par ELISA une liaison de la H_{CC}/B sur des exosomes SYT2 en absence de GT1b (**Fig S2**). L'ensemble de ces résultats indiquent d'une part que l'absence de GT1b dans des exosomes SYT2 se traduit par une diminution de l'affinité de la BoNT/B et de la H_{CC}/B par rapport à des exosomes SYT2/GT1b et d'autre part, qu'en présence ou absence de GT1b, la H_{CC}/B possède une affinité supérieure à celle de la BoNT/B pour la SYT2.

Afin de préciser la nature de l'interaction, nous avons mesuré l'affinité de la BoNT/B sur des exoSYT2 en présence ou absence de GT1b dans un tampon de force ionique élevée (**Tableau 1**). De façon claire l'augmentation d'affinité due au GT1b est quasiment perdue avec une forte concentration de sels ($K_D = 39$ versus $K_D = 52$ nM). Dans ces conditions, le k_{on} de la BoNT/B pour la SYT2 reste inchangé en présence ou absence de GT1b. Ce résultat suggère qu'une composante électrostatique joue un rôle majeur dans la phase de reconnaissance entre la neurotoxine et le co-récepteur. En absence de GT1b, une forte concentration de sels n'affecte pas le k_{on} alors que le k_{off} est légèrement accentué.

Toxin	Receptor	NaCl (mM)	k_{on} ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} \text{ M}$)	n
Hcc/B	exoSYT2	150	5.9 ± 1.9	1.5 ± 0.2	4 ± 2	3
	exoSYT2	150	1.5 ± 0.2	5.6 ± 0.1	39 ± 5	6
BoNT/B		350	0.8 ± 0.1	18.4 ± 3	228 ± 31	4
	exoSYT2+GT1b	150	23 ± 10	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.1	6
		350	0.8 ± 0.2	3.2 ± 1	52.5 ± 19.6	6

Tableau 1 : Constantes d'affinité de l'interaction de la BoNT/B avec les exoSYT2.

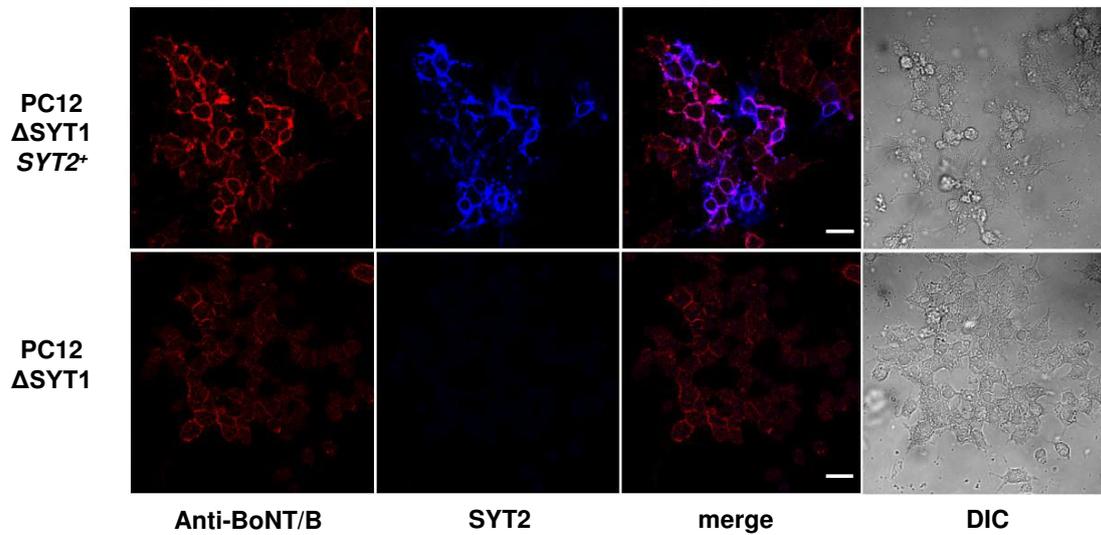
Liaison de la BoNT/B sur des cellules PC12 en absence de diffusion

Afin d'examiner l'interaction de la BoNT/B avec le complexe SYT2-GT1b, nous avons effectué des expériences dans des conditions défavorables à la diffusion du GT1b et SYT2 dans le plan de la membrane plasmique. Ainsi, nous avons réalisé des expériences en immunofluorescence à 4°C sur des cellules PC12 Δ SYT1 et PC12 Δ SYT1 SYT2⁺. Une liaison spécifique, avec une colocalisation de la SYT2 et la BoNT/B (5 nM), est détectée bien que le marquage soit plus faible qu'à température ambiante (**Fig. 5A**). Pour confirmer ce résultat nous avons développé un test ELISA avec les cellules PC12 Δ SYT1 SYT2⁺. Ce test nous a permis d'observer que la BoNT/B se lie spécifiquement aux cellules PC12 à 4°C et que cette liaison est inhibée par la pré-incubation de la BoNT/B avec un anticorps anti-BoNT/B (**Fig. 5B**). Le déficit de GT1b dans les cultures traitées avec le PPMP se traduit par une diminution de 60% de la liaison de la BoNT/B (**Fig. 5C**). Ces données soutiennent l'idée qu'il existe à la membrane plasmique une population de SYT2 et de GT1b suffisamment proches l'un de l'autre pour permettre la liaison simultanée de BoNT/B en absence de diffusion latérale.

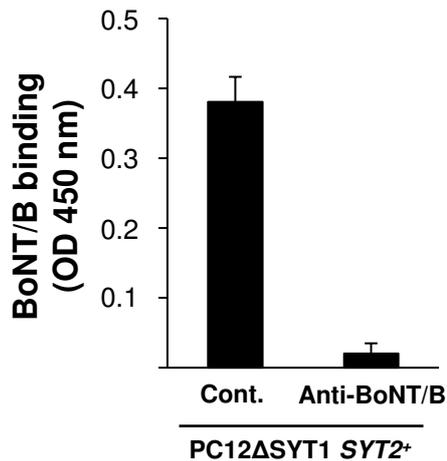
Mise en évidence d'une interaction entre la SYT et le GT1b

Des données anciennes indiquent que la SYT2 et le GT1b interagissent directement via la partie céramide du GT1b et le domaine transmembranaire de la SYT2 (Kozaki et al., 1998). D'autre part, des données cristallographiques montrent que le domaine 46-58 (**Fig. S3**) de la SYT2 interagit avec la BoNT/B (Chai et al., 2006; Jin et al., 2006) et que cette interaction induit la formation d'une hélice α amphiphile dans la SYT2. Aussi, le groupe de Jin a proposé que les lysines du domaine juxta membranaire de la SYT2, qui n'interagissent pas avec la toxine, se lient aux lipides de la membrane plasmique chargés négativement.

A



B



C

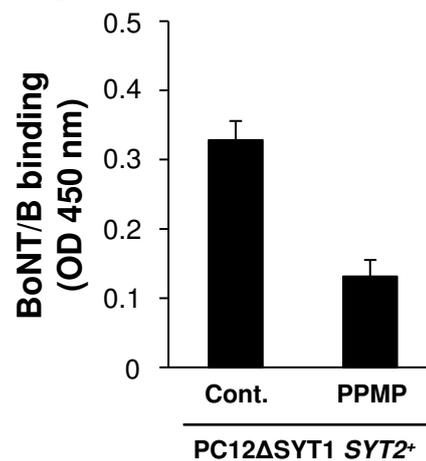


Figure 5 : Liaison de la BoNT/B à 4°C sur les cellules PC12ΔSYT1 SYT2⁺. (A) Colonne de gauche (BoNT/B) : Analyse en immunofluorescence de l'interaction de la BoNT/B (5 nM) à la surface des membranes de cellules PC12 exprimant la SYT2 (PC12ΔSYT1 SYT2⁺) ou non (PC12ΔSYT1). Deuxième colonne (SYT2): Détection de la SYT2. Troisième colonne (merge): colocalisation du marquage BoNT/B et SYT2. Les images de cellules en contraste de phase correspondant aux marquages dans les différentes conditions sont affichées dans la colonne de droite (DIC). La liaison de la BoNT/B est faiblement détectée à la surface des cellules PC12 exprimant la SYT2 (PC12ΔSYT1 SYT2⁺) et non à la surface des cellules contrôles (PC12ΔSYT1). La colocalisation partielle de la SYT2 et de la BoNT/B est visible à la surface des cellules exprimant la SYT2 (PC12ΔSYT1 SYT2⁺) (barre d'échelle = 15μm). (B) Quantification colorimétrique de la liaison de la BoNT/B sur les cellules PC12 avec ou sans préincubation avec un anticorps anti-BoNT/B. La pré-incubation de la BoNT/B avec un anticorps neutralisant réduit significativement le niveau de BoNT/B détecté sur les cellules. Résultats représentatifs de 2 expériences indépendantes. La liaison de la BoNT/B sur les cellules PC12 contrôles (PC12ΔSYT1) a été soustraite de celle obtenue pour les cellules exprimant la SYT2 (PC12ΔSYT1 SYT2⁺).

(C) Effet du PPMP sur la liaison de la BoNT/B (5 nM) sur les cellules PC12 à 4°C. Détection en ELISA de la liaison de la BoNT/B (5 nM) à 4°C sur des cellules PC12 exprimant la SYT2 (PC12ΔSYT1 SYT2⁺) traitées ou non avec le PPMP. Les niveaux de liaison de la BoNT/B obtenus avec des cellules contrôles non transfectées (PC12ΔSYT1) ont été soustraits à ceux obtenus avec les PC12ΔSYT1 SYT2⁺ dans chaque condition. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Nous avons cherché à répondre à cette question en utilisant la SPR. Le GT1b interagit avec une protéine de fusion GST-SYT2 immobilisée sur la sensorchip du biosenseur (**Fig. 6A**). Afin de préciser les domaines de liaison SYT2-GT1b et d'étudier directement l'interaction avec des séquences juxta-membranaires du domaine luminal de la SYT2, nous avons testé par SPR l'interaction des peptides 49-60 et 40-66 de la SYT2 avec des liposomes PC/GT1b immobilisés sur sensorchip. La figure 6B montre que les deux peptides interagissent avec le GT1b et que le peptide 40-66 est plus fortement retenu sur les liposomes GT1b que le peptide plus court 49-60 (**Fig. 6B**). L'injection d'une gamme de concentration du peptide 40-66 (**Fig. 6C, D**) a permis de mesurer un K_D de 3 +/- 1.5 μ M (n = 4 expériences indépendantes). Ces résultats indiquent que le domaine juxta-membranaire extra-cellulaire de SYT2 est capable de s'associer spécifiquement au GT1b.

Le GT1b potentialise la liaison de la BoNT/B sur le domaine juxta-membranaire de la SYT2

Afin de reconstituer une configuration où le GT1b et la SYT sont dans le même plan de membrane et de tester l'effet de leur proximité sur l'interaction avec la BoNT/B, nous avons examiné la liaison de la BoNT/B sur le peptide 40-66 myristylé en position C-terminale (*Myr-SYT2(40-66)*) et reconstitué dans des liposomes. Les peptidoliposomes ont été immobilisés sur une sensorchip. La BoNT/B se lie fortement sur les peptidoliposomes dopés en GT1b, et faiblement sur les peptidoliposomes non dopés. Aucune liaison n'est observée sur des liposomes dopés en GT1b. Dans le même type d'expérience, la BoNT/A ne se lie pas sur les peptidoliposomes aussi bien en absence qu'en présence de GT1b (**Fig. 7**). Ces expériences indiquent que le GT1b potentialise la liaison de la BoNT/B sur le co-récepteur SYT/GT1b indépendamment du domaine transmembranaire de la SYT.

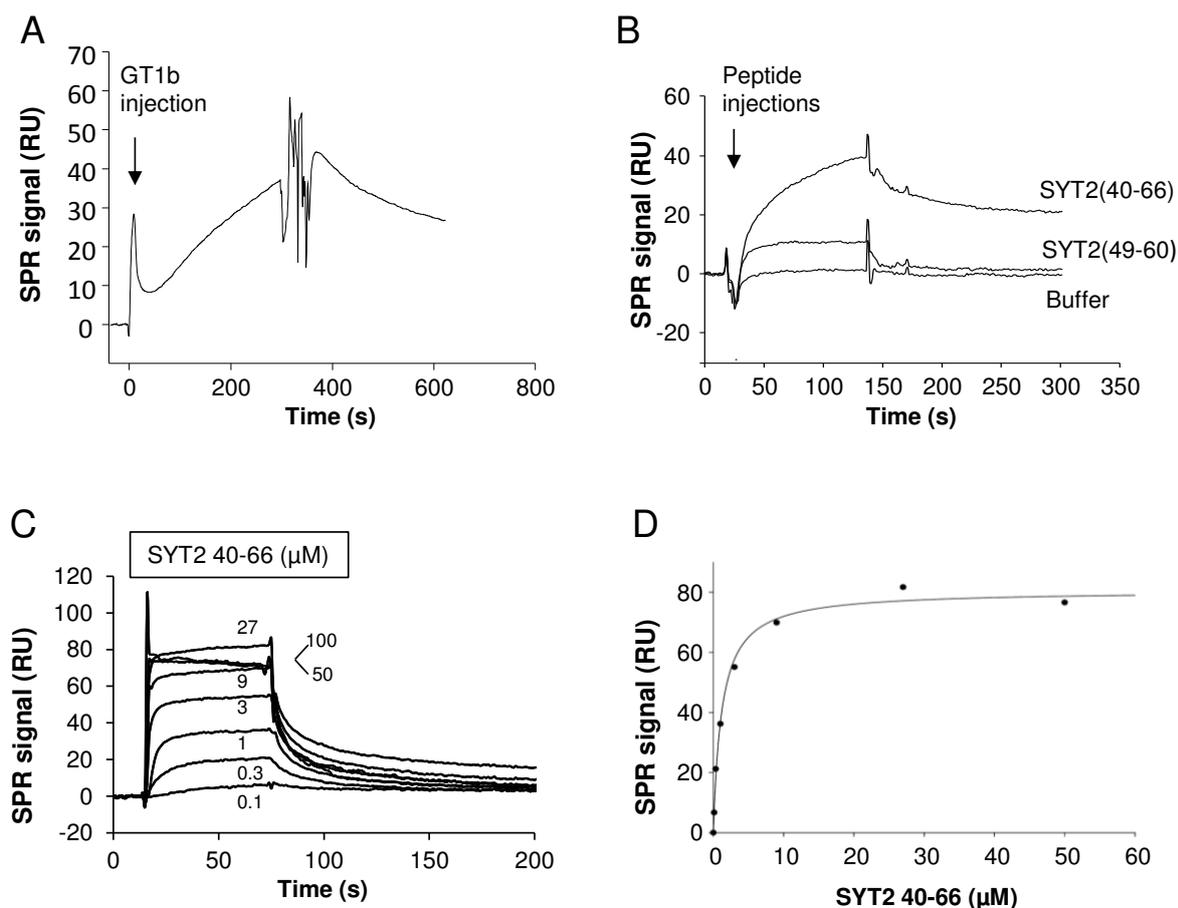


Figure 6 : Mesure d'interaction entre la SYT2 et le GT1b en SPR. **(A)** Détection de la liaison du GT1b sur la protéine recombinante GST-SYT2 purifiée en détergent, et immobilisée sur la sensorchip du biosenseur. La liaison non spécifique du GT1b sur la GST a été soustraite du sensorgramme présenté **(B)** Détection de liaison des peptides SYT2 (40-66) et SYT2 (49-60) injectés respectivement à 3 et 30μM sur des liposomes PC/GT1b. **(C)** Gamme dose-réponse de l'interaction du peptide 40-66 avec des protéoliposomes SYT2/GT1b. La liaison non spécifique des peptides sur les liposomes dépourvus de GT1b a été soustraite du sensorgramme présenté **(D)** Quantification des données de la figure C (valeurs mesurées au plateau).

Modélisation de l'interaction SYT-GT1b

L'interaction moléculaire entre un peptide SYT2 comprenant le domaine transmembranaire et une partie du domaine N-terminal extra-cellulaire en sortie de membrane (49-79) et le GT1b a été modélisée (**Fig. 8A**). Les résultats de cette étude *in silico* montrent une complémentarité structurale entre le GT1b et la SYT2, à la fois entre les parties apolaires et polaires des deux molécules. L'énergie d'interaction calculée à partir des complexes moléculaires obtenus par modélisation est élevée (-161 kJ/mol).

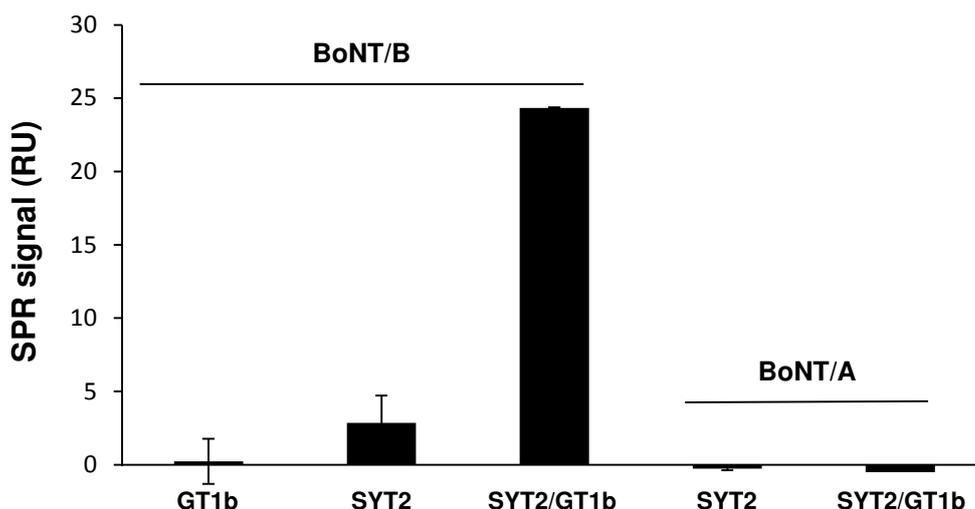
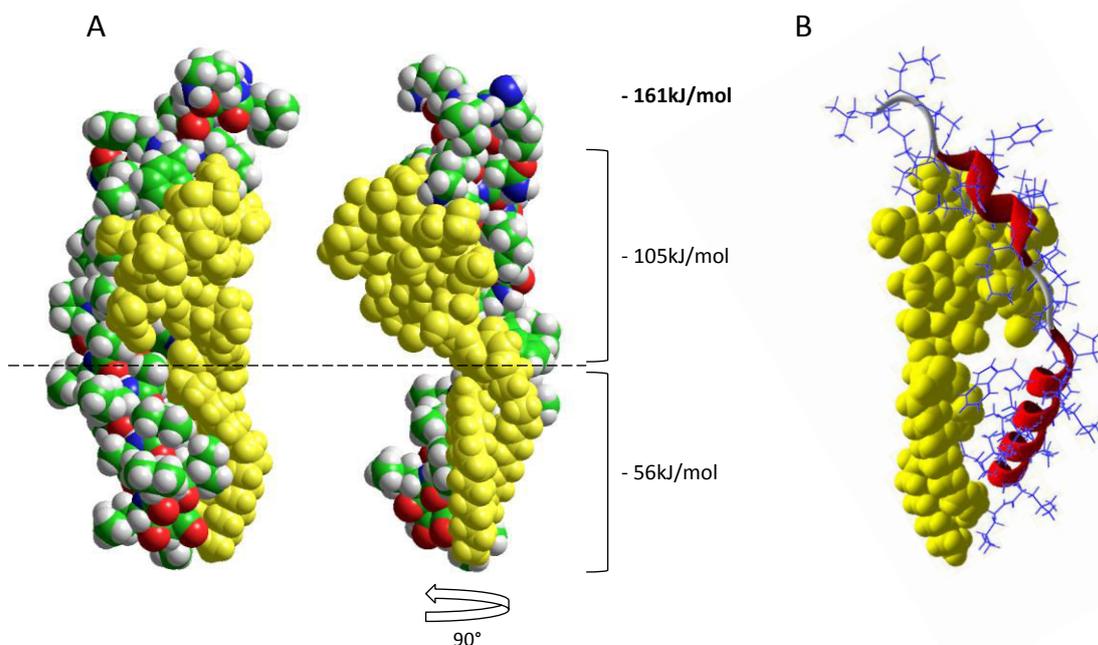


Figure 7: Mesure de liaison de la BoNT/B sur des peptidoliposomes SYT2 Δ TM. La liaison de la BoNT/B (2 nM) a été mesurée par SPR sur des peptidoliposomes Myr-SYT2(40-66) avec ou sans GT1b et dans lesquels le domaine transmembranaire de la SYT2 a été remplacé par un groupement myristyl. Pour chaque condition, une piste contrôle est constituée de liposomes avec ou sans GT1b. Les signaux montrés correspondent au binding spécifique résultant de la soustraction des signaux obtenus sur la piste contrôle.

Il est intéressant de noter que près des deux tiers de cette énergie (-105 kJ/mol) rend compte de l'association du domaine extra-membranaire de la SYT et de la partie oligosaccharidique du GT1b. La modélisation du complexe SYT2-GT1b suggère que la région riche en proline induit la formation d'un coude à 45° en sortie de membrane et que le domaine juxta-membranaire de la SYT2 possède une structure secondaire en hélice α stabilisée par le GT1b (**Fig. 8B**). La modélisation indique que les acides aminés Leu₅₀, Lys₅₃, Phe₅₄, Glu₅₇, Ile₅₈, Lys₆₀ et Trp₆₆ du domaine extra cellulaire de la SYT2 présentent les énergies d'interaction les plus fortes (**Fig. 8**). Du fait de la forte densité de charges négatives au niveau de la partie saccharidique de GT1b et de la présence d'acides aminés cationique au niveau du domaine extracellulaire de SYT2, on aurait pu émettre l'hypothèse d'une interaction de faible affinité de nature électrostatique. Les résultats obtenus par modélisation moléculaire remettent en cause cette interprétation. En fait, le complexe SYT2-GT1b fait intervenir essentiellement des liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals (forces de London). Ces interactions impliquent notamment les résidus de galactose, de N-acétyl-galactosamine et d'acide sialique (mais dans ce dernier cas en dehors des groupements acide carboxylique). Globalement, les résultats de modélisation moléculaires sont compatibles avec les mesures d'interaction par SPR. Ainsi l'ensemble de ces résultats

suggèrent un modèle dans lequel la SYT, par l'intermédiaire de son domaine transmembranaire et de sa région juxtamembranaire, interagit fortement avec le GT1b (**Fig. 8**). L'interaction de la partie apolaire du peptide correspondant au domaine transmembranaire de SYT2 avec la partie céramide du ganglioside pourrait aussi provoquer une réorganisation globale du complexe SYT2-GT1b. Ce mécanisme conformationnel s'apparente à un phénomène d'ajustement induit ("induced fit") qui aboutit à l'acquisition d'une conformation fonctionnelle du domaine extracellulaire sous l'influence des groupements de SYT2 et de GT1b insérés dans la phase apolaire de la membrane. Ce mécanisme d'induction conformationnelle dans le cadre d'un complexe protéine-ganglioside a été démontré pour plusieurs types de protéines cellulaires et pathogènes (Fantini et al., 2013).



SYT2 : 49-K L K D K F F N E I N K I P L P P W A L I A M A V V A G L L L -79

Figure 8: Modèle proposé pour la reconnaissance SYT2 -GT1b. (A) Représentation de l'interaction entre le domaine (49-79) de la SYT2 (molécule multicolore) et le GT1b (molécule jaune). Les acides aminés impliqués dans l'interaction sont représentés en rouge dans la séquence au bas de la figure. (B) Représentation de la structure secondaire de SYT2 associée à GT1b. Les deux hélices α sont colorées en rouge. Le domaine séparant les hélices correspond à la partie riche en résidus Proline (en gris dans le modèle).

Effet de la mutation K60A de SYT2 sur la liaison de la BoNT/B

Afin de perturber l'interaction SYT-GT1b sans affecter directement l'interaction avec la BoNT/B, nous avons ciblé par une mutation ponctuelle la lysine 60 (K60), acide aminé non impliqué dans le site de liaison de la BoNT/B, mais qui par sa position juxtamembranaire et comme suggéré par les données de modélisation, pourrait être déterminant pour l'interaction SYT-GT1b.

Nous avons premièrement mesuré par SPR l'effet de cette mutation sur la liaison du peptide SYT2 (49-60) sur du GT1b inséré dans des liposomes (**Fig. 9**). La mutation K60A diminue la liaison au GT1b de $56 \pm 2\%$ (moyenne \pm SD de 4 expériences indépendantes).

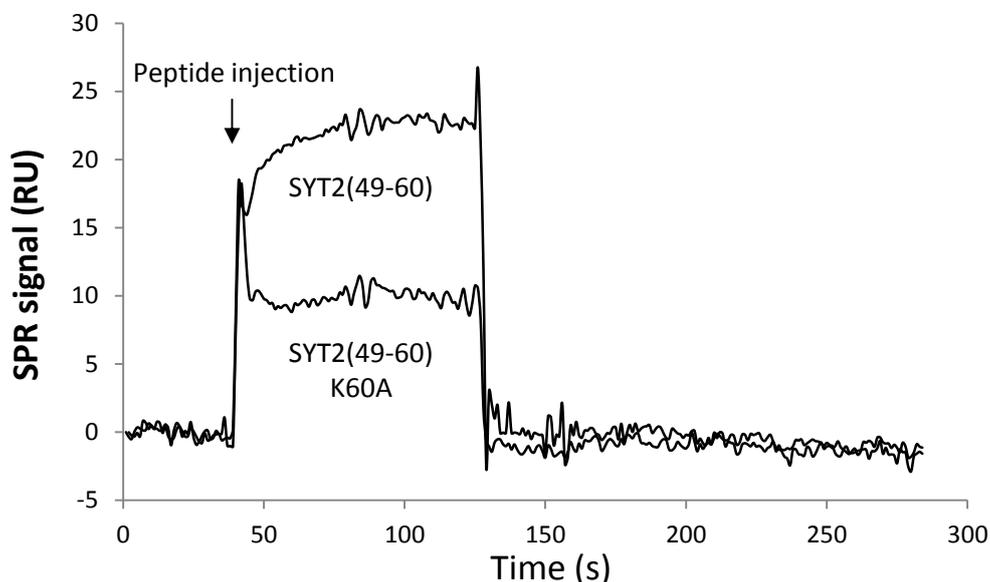


Figure 9: Effet de la mutation K60A sur l'interaction entre la SYT2 et le GT1b. Détection de liaison du peptide SYT2 (49-60) sauvage ou mutant (K60A) sur des liposomes immobilisés et enrichis en GT1b. Les signaux obtenus pour chacun des peptides sur des liposomes non enrichis en GT1b ont été soustraits aux signaux obtenus avec les liposomes enrichis en GT1b. Résultats représentatif de 4 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite examiné les répercussions de cette mutation sur l'interaction en co-précipitation de la BoNT/B avec la GST-SYT2 en présence de GT1b. En présence de détergent, on observe une diminution du niveau de liaison de la BoNT/B sur la GST-SYT2K60A de $74 \pm 8\%$ (moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes) (**Fig. 10A, B**). La même expérience a été réalisée avec la SYT2 reconstituée dans des liposomes. Dans ce cas, la mutation K60A induit une diminution de $53 \pm 25\%$ (moyenne \pm SD de 4 expériences indépendantes) de la liaison de la BoNT/B par rapport à la GST-SYT2 sauvage (**Fig. 10C, D**).

Nous avons effectué un test ELISA d'interaction de la BoNT/B à 4°C sur des cellules transfectées. Après avoir vérifié que le niveau d'expression des différentes constructions transfectées était équivalent (**Fig. 11A**), en présence de GT1b exogène, nous avons observé que la mutation K60A induit une diminution de $44 \pm 13\%$ ($p < 0,01$, moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes) du niveau de liaison de la BoNT/B, et la double mutation K60A, K53A une diminution plus importante atteignant $63 \pm 10\%$ ($p < 0,01$, moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes).

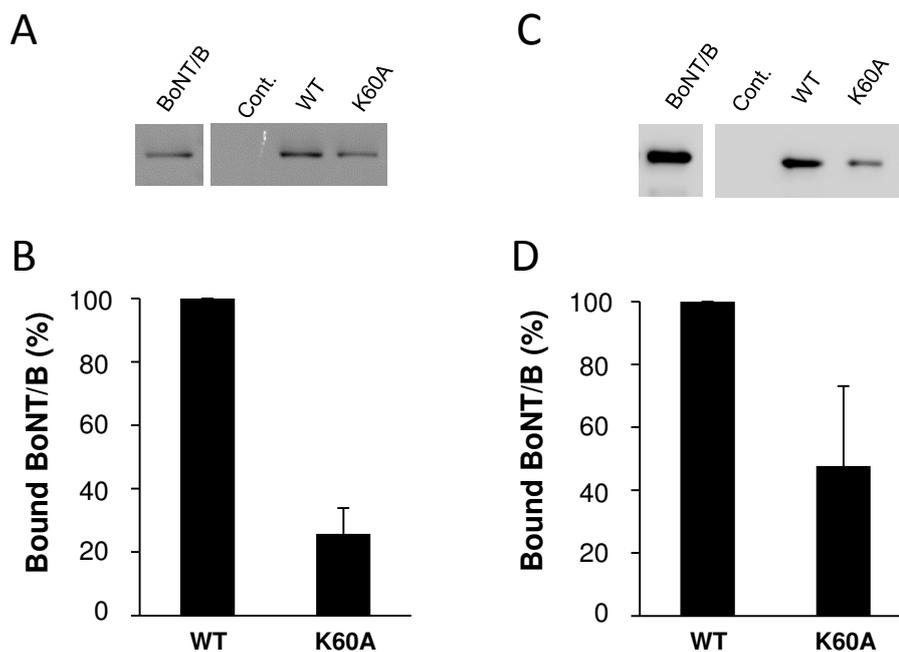


Figure 10: Effet de la mutation K60A sur la liaison de la BoNT/B avec la GST-SYT2 en co-précipitation. (A) Détection de la BoNT/B liée à la GST (Cont), GST-SYT2 (WT) et à la GST-SYT2K60A (K60A) en présence de détergent. Un contrôle positif de détection de la BoNT/B figure à gauche (BoNT/B). (B) Quantification par densitométrie de l'expérience montrée en A (SD = moyennes de 3 expériences indépendantes). (C) Interaction de la BoNT/B avec la GST (Cont), GST-SYT2 (WT) et GST-SYT2-K60A (K60A) reconstituée dans des protéoliposomes. (D) Quantification par densitométrie de l'expérience montrée en C (SD = moyennes de 4 expériences indépendantes). Pour chacune des expériences le signal de liaison obtenu sur la GST seule a systématiquement été retranché aux signaux obtenus avec les deux types de GST-SYT2. Les niveaux de liaison sont exprimés en pourcentage et le signal obtenu avec la GST-SYT2 sauvage (WT) a été pris pour référence à 100%.

Ces résultats montrent que la mutation de la lysine 60 impliquée dans l'interaction de la SYT avec le GT1b induit une perte d'affinité de la BoNT/B pour le complexe SYT2-GT1b. De plus, cet effet est amplifié par la mutation supplémentaire de la lysine 53, dont l'implication est aussi prédite par la modélisation de l'interaction du domaine juxta-membranaire de la SYT avec le GT1b.

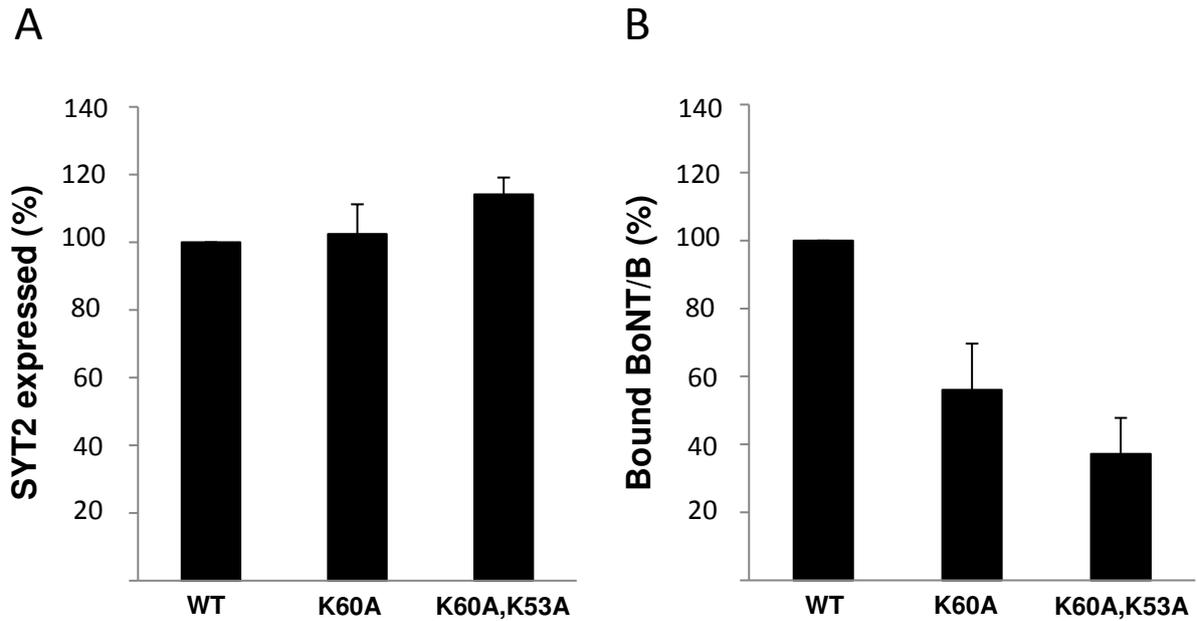


Figure 11: Effets de la mutation K60A et de la double mutation K60A, K53A sur la liaison à 4°C de la BoNT/B sur des cellules PC12 exprimant la SYT2. Les cellules Δ SYT1PC12 ont été transfectées avec un plasmide codant pour la SYT2 sauvage (WT), un simple mutant de SYT2 (K60A), ou un double mutant de SYT2 (K60A,K53A), puis incubées avec du GT1b exogène (10 μ M). **(A)** Détection de la SYT2 exprimée à la surface des cellules PC12 transfectées avec les différents plasmides **(B)** Détection de la BoNT/B liée à la surface des cellules PC12 transfectées avec les différents plasmides. La mutation K60A induit une diminution du niveau de liaison de $44 \pm 13\%$ et la double mutation (K60A,K53A), une diminution plus importante de $63 \pm 10\%$. Résultats représentant la moyenne de 3 expériences indépendantes. Pour chacune des expériences, le signal obtenu avec des cellules contrôles non transfectées a systématiquement été retranché aux signaux obtenus avec les trois types de cellules exprimant la SYT2. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au signal obtenu avec la SYT2 sauvage.

DISCUSSION

La membrane plasmique constitue une interface réagissant aux stimuli physiologiques, mais représente aussi le site de fixation de nombreux pathogènes. L'extrémité N-terminale de la SYT2 ainsi que les gangliosides localisés dans feuillet externe de la membrane neuronale constituent les récepteurs de la BoNT/B, une neurotoxine impliquée dans le botulisme. Le but de cette étude vise à disséquer la séquence d'évènements conduisant à l'attachement de la BoNT/B aux terminaisons nerveuses périphériques. Pour cela, nous avons premièrement mesuré de façon indépendante l'interaction de la BoNT/B avec chacun des deux récepteurs dans le cas où ils sont associés à une membrane lipidique.

Nos résultats montrent qu'à des concentrations élevées (10 nM), la BoNT/B n'interagit pas avec les membranes des cellules PC12 dépourvues de SYT et exprimant naturellement du GT1b ni avec des cellules dans lesquelles du GT1b a été rajouté artificiellement. Nous n'avons pas non plus détecté en ELISA une interaction de la BoNT/B sur du GT1b inséré dans des membranes exosomales (exoGT1b). Cependant, l'utilisation de la SPR a permis de révéler une interaction BoNT/B-exoGT1b labile, à des concentrations de BoNT/B supérieures ou égale à 30 nM, mais présentant des cinétiques complexes qui n'ont pu être quantifiées. Ce résultat est cohérent avec d'autres résultats montrant une absence de liaison de BoNT/B sur des liposomes GT1b (Kozaki et al., 1998; Sun et al., 2011), des cellules exprimant le GT1b en absence de la SYT (Nishiki et al., 1996b; Dong et al., 2007) ou des synaptosomes traités avec une protéase (Evans et al., 1986). L'affinité de la BoNT/B pour le GT1b est donc particulièrement faible comparée à celle de la toxine cholérique pour le GM1 ($K_D = 10^{-12}M$) mesurée par SPR (Kuziemko et al., 1996) ou de la toxine tétanique pour le GT1b ($K_D = 2 \cdot 10^{-9}M$), (Goldberg et al., 1981; Chen et al., 2009). Cette faible affinité est probablement liée au fait que la BoNT/B possède un seul site de liaison au GT1b, contrairement à d'autres toxines qui ont plusieurs sites de reconnaissance pour un récepteur de nature lipidique comme la BoNT/C, la BoNT/D, la toxine tétanique ou la toxine cholérique (Rummel et al., 2003a, 2003b).

Cette étude effectuée avec du GT1b associé à une membrane confirme donc la conclusion résultant d'expériences effectuées avec du GT1b non associé à des membranes, à savoir que la BoNT/B possède une affinité très faible pour le GT1b probablement entre 200 nM et 1 μM (Kohda et al., 2007; Rummel, 2015). Elle montre d'autre part que la BoNT/B

dissocie rapidement après l'étape de fixation, empêchant la détection de cette interaction par des méthodes incluant plusieurs lavages tel que l'ELISA. Par ailleurs, les données de la littérature montrent que les gangliosides lient préférentiellement les BoNTs dans des milieux de faible force ionique (Kitamura et al., 1980; Ochanda et al., 1986; Lalli et al., 1999; Ahn-Yoon et al., 2004) et que l'interaction peut être dissociée en utilisant une force ionique élevée (Yowler and Schengrund, 2004). L'ensemble de ces données vont dans le sens d'une interaction GT1b-BoNT/B qui serait principalement de type électrostatique et de faible affinité. Ainsi, même s'il est indiscutable que les gangliosides sont nécessaires pour une interaction de haute affinité permettant une activité toxique à des concentrations très faibles de BoNT/B, il est peu probable qu'en absence de SYT, le GT1b puisse être, à proprement dit, un récepteur capable de capturer la toxine de façon stable sur des terminaisons nerveuses.

Nous avons détectée une interaction de la BoNT/B sur des cellules en culture exprimant la SYT mais dépourvues de GT1b. La liaison de BoNT/B est faible mais spécifique à 5 nM avec un marquage qui augmente significativement à 40 nM, concentration pour laquelle environ la moitié des sites sont occupés suivant nos résultats de mesure d'affinité avec des exoSYT2. Ce résultat est en adéquation avec les données montrant que la diminution de la liaison et d'internalisation de BoNT/B n'est pas totale sur des cellules PC12 traitées avec un inhibiteur de synthèse des gangliosides (Chai et al., 2006) ou des cellules d'hippocampe en culture provenant de souris déficientes en gangliosides (Dong et al., 2007). Nous présentons ici la première mesure d'affinité de la BoNT/B pour la SYT2 dans des membranes natives. En effet, alors que plusieurs articles rapportent une liaison de BoNT/B sur la SYT2 en solution, il n'y a pas de données dans la littérature sur des mesures d'affinité de la BoNT/B pour la SYT2 dans des membranes biologiques en absence de GT1b. Aussi, nous avons montré que la présence de GT1b induit une augmentation d'un facteur 65 de l'affinité de la BoNT/B pour la SYT2, en comparant avec les résultats de notre précédente étude (Desplantes et al., 2017). De manière intéressante, la mesure des constantes cinétiques révèle que la moindre affinité de la BoNT/B sur la SYT2 en absence de GT1b est due principalement à une diminution de la constante cinétique d'association. L'effet de potentialisation du GT1b sur la liaison de la BoNT/B à la SYT est contrecarrée par une forte teneur de sels dans le milieu. Une interprétation possible serait que le GT1b jouerait un rôle d'attracteur électrostatique avant d'ancrer la toxine via une cavité spécifique présente à l'extrémité C-terminale de la BoNT/B, comme suggéré (Fogolari et al., 2009). D'autre part, l'absence de GT1b produit aussi

une augmentation d'un facteur 4 de la constante de dissociation SYT2-BoNT/B. Cela pourrait expliquer pourquoi à des concentrations inférieures au K_D , l'interaction SYT2-BoNT/B, n'a pas été détectée en absence de GT1b sur des exoSYT2 ou des protéoliposomes SYT2 (Desplantes et al., 2017; Kozaki et al., 1998), avec des techniques nécessitant plusieurs étapes de lavages.

Alors que les expériences *in vitro* utilisant des exosomes (Desplantes et al., 2017), des protéoliposomes (Kozaki et al., 1998), des micelles mixtes détergent/GT1b-SYT2 (Dong et al., 2003) peuvent induire une proximité artificielle de la SYT2 et du GT1b, les expériences de liaison avec une faible concentration de BoNT/B sur des cellules PC12 à 4°C, suggèrent la présence de deux récepteurs localisés de façon suffisamment proche pour constituer un site de haute affinité. En effet, nos conditions expérimentales sont très en défaveur d'une interaction avec le GT1b, suivie d'une diffusion du complexe BoNT/B-ganglioside dans la membrane, avant fixation sur la SYT2. En réexaminant les données de la littérature, on trouve que la BoNT/A et la BoNT/B se fixent sur des membranes biologiques à 4°C sur des cellules en culture (Couesnon et al., 2009), des synaptosomes (Dolly et al., 1982; Blasi et al., 1992; Lalli et al., 1999; Keller et al., 2004) ou une préparation *ex-vivo* de JNM (Black and Dolly, 1986). Dans tous ces exemples, compte tenu des concentrations basses de toxine utilisées, il est très peu probable que cette interaction résulte d'une liaison sur le GT1b ou même sur la SYT seule. Il s'agirait plutôt d'une interaction avec un double récepteur (SYT-GT1b) pré-formé en complexe, ou du moins dont les composants seraient à une distance compatible avec une double fixation directe de la BoNT/B, soit environ 15 Å.

En utilisant un peptide issu de la région juxta-membranaire de la SYT2, nous avons mis en évidence une interaction directe avec le GT1b. L'affinité entre ce peptide et le GT1b inséré dans des liposomes est de 3 μ M. Il est probable que lorsque la SYT et le GT1b se trouvent en cis dans un même plan membranaire, l'affinité soit accrue par une liaison entre le domaine transmembranaire de la SYT et la partie céramide du GT1b comme suggéré par S. Kozaki (Kozaki et al., 1998). La modélisation de l'interaction entre le GT1b et le domaine juxta-membranaire et transmembranaire de la SYT2 ou de la SYT1 a révélé une complémentarité de forme entre les deux partenaires autant par les résidus apolaires que par les résidus polaires. Le domaine extracellulaire de la SYT (1 ou 2) porte la majorité des résidus impliqués dans cette interaction théorique, représentant les deux tiers de l'énergie d'interaction globale. Le domaine juxta membranaire de SYT1 et SYT2 possède d'ailleurs un

motif consensus de reconnaissance des glycosphingolipides (Fantini and Yahji, 2011) avec un résidu phenylalanine en position centrale (Phe_{54/55} pour SYT2 et Phe₄₆ pour SYT1) bordés par des résidus chargés positivement, en l'occurrence des lysines (Lys_{51/60} pour SYT2 et Lys_{43/52} pour SYT1). Alors qu'en solution, le domaine juxta-membranaire de la SYT n'est pas prédit comme étant structuré, nos données de modélisation indiquent que le domaine juxta-membranaire de la SYT associée au GT1b adopte une structure en hélice α , comme ce qui a été observé dans les cristaux SYT-BoNT/B (Jin et al., 2006).

En solution, le GT1b n'induit pas de potentialisation de la liaison entre le domaine extra cellulaire de la SYT et la BoNT/B (Berntsson et al., 2013) contrairement à la situation où la SYT entière est présentée avec le GT1b dans une micelle ou membrane (Dong et al., 2003). Nous avons pu mesurer une potentialisation de la liaison de la BoNT/B sur le GT1b en remplaçant le domaine transmembranaire de la SYT2 par un groupement myristyl. Cela suggère que la potentialisation par le GT1b se produit lorsque les deux récepteurs se positionnent en cis dans une membrane, soit dans des conditions où le N-ter de la SYT peut interagir avec la partie oligosaccharidique du GT1b. Ainsi le GT1b potentialiserait la liaison de BoNT/B sur la SYT indépendamment d'une interaction entre les domaines apolaires des deux récepteurs.

Il est à noter que le peptide de la SYT utilisé dans notre étude d'interaction avec le GT1b correspond globalement à la région juxta membranaire de la SYT qui lie la BoNT/B. Nous nous sommes intéressé particulièrement au résidu de lysine 60 de la SYT2 qui ne s'engage pas dans une interaction avec la BoNT/B (Chai et al., 2006; Jin et al., 2006) et qui possède une énergie d'interaction élevée avec le GT1b prédite par modélisation. Nous avons montré que la mutation K60A provoque une perturbation de l'interaction entre la partie luminale de la SYT2 et le GT1b et que cette même mutation inhibe de manière significative le niveau de liaison de la BoNT/B sur son double récepteur présenté en cis dans des liposomes. Si l'on tient compte du fait que le résidu K60 n'est pas engagé dans la liaison avec la BoNT/B, ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur de la mutation K60A sur la liaison de la BoNT/B est causé par une perturbation de l'interaction entre la SYT et le GT1b. Cet effet est encore augmenté par une mutation sur la Lys₅₃ qui interagit de façon prédictive avec le GT1b mais qui n'interagit pas ou peu suivant les études avec la BoNT/B (Chai et al., 2006; Jin et al., 2006) et dont la mutation n'affecte visiblement pas l'interaction avec la BoNT/B (Stenmark et al., 2010). En contraste de la SYT2, la présence de GT1b est indispensable à l'interaction

de SYT1 avec la BoNT/B (Dong et al., 2003). La mutation de la première lysine juxtamembranaire de la SYT1 (K52), résidu dont le positionnement est équivalent à la lysine 60 de SYT2, perturbe l'interaction de SYT1 avec la BoNT/B. En effet, la mutation K52A induit une abolition totale de la liaison de BoNT/B sur la SYT1 reconstituée dans des liposomes en présence de GT1b. Nos données montrent donc que la K60 localisée en dehors du site de liaison, SYT2(46-58) d'après les données de cristallographie, joue un rôle important pour la liaison de la BoNT/B probablement par son interaction avec le GT1b.

L'ensemble de nos résultats nous permettent de proposer que la reconnaissance par la BoNT/B des récepteurs neuronaux cellulaires passe par une interaction avec un complexe SYT-GT1b pré-assemblé qui constituerait un double récepteur de haute affinité, plutôt que par une liaison initiale sur le GT1b ou la SYT seule. Comme plusieurs acides aminés impliqués dans l'interaction avec le GT1b le sont aussi dans l'interaction avec la BoNT/B, la liaison de la BoNT/B sur le complexe pré-assemblé devrait déplacer la molécule de GT1b associée à la SYT. Cette molécule de GT1b pourrait alors se loger dans la poche de la toxine spécifique pour le GT1b. Alternativement, la BoNT/B se lierait sur une autre molécule de GT1b présente dans l'environnement membranaire tout en se liant sur un complexe SYT/GT1b.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn-Yoon, S., DeCory, T.R., and Durst, R.A. (2004). Ganglioside-liposome immunoassay for the detection of botulinum toxin. *Anal. Bioanal. Chem.* *378*, 68–75.
- Bakry, N.M., Kamata, Y., and Simpson, L.L. (1997). Expression of botulinum toxin binding sites in *Xenopus* oocytes. *Infect. Immun.* *65*, 2225–2232.
- Berntsson, R.P.-A., Peng, L., Dong, M., and Stenmark, P. (2013). Structure of dual receptor binding to botulinum neurotoxin B. *Nat. Commun.* *4*.
- Black, J.D., and Dolly, J.O. (1986). Interaction of ¹²⁵I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J. Cell Biol.* *103*, 521–534.
- Blasi, J., Egea, G., Castiella, M.J., Arribas, M., Solsona, C., Richardson, P.J., and Marsal, J. (1992). Binding of botulinum neurotoxin to pure cholinergic nerve terminals isolated from the electric organ of *Torpedo*. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* *90*, 87–102.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C., and Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* *256*, 1021–1025.
- Bullens, R.W., O’Hanlon, G.M., Wagner, E., Molenaar, P.C., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, J.J., and Willison, H.J. (2002). Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J. Neurosci.* *22*, 6876–6884.
- Chai, Q., Arndt, J.W., Dong, M., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2006). Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* *444*, 1096–1100.
- Chen, C., Fu, Z., Kim, J.-J.P., Barbieri, J.T., and Baldwin, M.R. (2009). Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin. *J. Biol. Chem.* *284*, 26569–26577.
- Couesnon, A., Shimizu, T., and Popoff, M.R. (2009). Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells. *Cell. Microbiol.* *11*, 289–308.
- Desplantes, R., Lévêque, C., Muller, B., Lotierzo, M., Ferracci, G., Popoff, M., Seagar, M., Mamoun, R., and El Far, O. (2017). Affinity biosensors using recombinant native membrane proteins displayed on exosomes: application to botulinum neurotoxin B receptor. *Sci. Rep.* *7*.
- Diril, M.K., Wienisch, M., Jung, N., Klingauf, J., and Haucke, V. (2006). Stonin 2 is an AP-2-dependent endocytic sorting adaptor for synaptotagmin internalization and recycling. *Dev. Cell* *10*, 233–244.
- Dolly, J.O., Williams, R.S., Black, J.D., Tse, C.K., Hambleton, P., and Melling, J. (1982). Localization of sites for ¹²⁵I-labelled botulinum neurotoxin at murine neuromuscular junction and its binding to rat brain synaptosomes. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *20*, 141–148.
- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* *162*, 1293–1303.
- Dong, M., Tepp, W.H., Liu, H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2007). Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* *179*, 1511–1522.

- Evans, D.M., Williams, R.S., Shone, C.C., Hambleton, P., Melling, J., and Dolly, J.O. (1986). Botulinum neurotoxin type B. *Eur. J. Biochem.* *154*, 409–416.
- Fantini, J., and Yahi, N. (2011). Molecular basis for the glycosphingolipid-binding specificity of α -synuclein: key role of tyrosine 39 in membrane insertion. *J. Mol. Biol.* *408*, 654–669.
- Fantini, J., Yahi, N., and Garmy, N. (2013). Cholesterol accelerates the binding of Alzheimer's β -amyloid peptide to ganglioside GM1 through a universal hydrogen-bond-dependent sterol tuning of glycolipid conformation. *Front. Physiol.* *4*, 120.
- Fogolari, F., Tosatto, S.C.E., Muraro, L., and Montecucco, C. (2009). Electric dipole reorientation in the interaction of botulinum neurotoxins with neuronal membranes. *FEBS Lett.* *583*, 2321–2325.
- Fukuda, M. (2002). Vesicle-associated membrane protein-2/synaptobrevin binding to synaptotagmin I promotes O-glycosylation of synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* *277*, 30351–30358.
- Goldberg, R.L., Costa, T., Habig, W.H., Kohn, L.D., and Hardegree, M.C. (1981). Characterization of fragment C and tetanus toxin binding to rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* *20*, 565–570.
- Han, W., Rhee, J.-S., Maximov, A., Lao, Y., Mashimo, T., Rosenmund, C., and Südhof, T.C. (2004). N-glycosylation is essential for vesicular targeting of synaptotagmin 1. *Neuron* *41*, 85–99.
- de Haro, L., Ferracci, G., Opi, S., Iborra, C., Quetglas, S., Miquelis, R., Lévêque, C., and Seagar, M. (2004). Ca²⁺/calmodulin transfers the membrane-proximal lipid-binding domain of the v-SNARE synaptobrevin from cis to trans bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1578–1583.
- Harris, K.P., and Littleton, J.T. (2015). Transmission, Development, and Plasticity of Synapses. *Genetics* *201*, 345–375.
- Jin, R., Rummel, A., Binz, T., and Brunger, A.T. (2006). Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* *444*, 1092–1095.
- Karalewitz, A.P.-A., Fu, Z., Baldwin, M.R., Kim, J.-J.P., and Barbieri, J.T. (2012). Botulinum Neurotoxin Serotype C Associates with Dual Ganglioside Receptors to Facilitate Cell Entry. *J. Biol. Chem.* *287*, 40806–40816.
- Keller, J.E., Cai, F., and Neale, E.A. (2004). Uptake of Botulinum Neurotoxin into Cultured Neurons. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 526–532.
- Kitamura, M., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1980). Interaction between Clostridium botulinum neurotoxin and gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* *628*, 328–335.
- Kohda, T., Ihara, H., Seto, Y., Tsutsuki, H., Mukamoto, M., and Kozaki, S. (2007). Differential contribution of the residues in C-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin type B to its binding to the ganglioside GT1b and the synaptotagmin 2/GT1b complex. *Microb. Pathog.* *42*, 72–79.
- Kozaki, S., Kamata, Y., Watarai, S., Nishiki, T., and Mochida, S. (1998). Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins. *Microb. Pathog.* *25*, 91–99.
- Kuziemko, G.M., Stroh, M., and Stevens, R.C. (1996). Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 6375–6384.

- Lalli, G., Herreros, J., Osborne, S.L., Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. (1999). Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 16)*, 2715–2724.
- Ledeen, R.W. (1984). Biology of gangliosides: neuritogenic and neuronotrophic properties. *J. Neurosci. Res.* *12*, 147–159.
- Montecucco, C. (1986). How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.* *11*, 314–317.
- Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. (2004). Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* *12*, 442–446.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1996a). The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett.* *378*, 253–257.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sekiguchi, M., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1996b). Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci. Lett.* *208*, 105–108.
- Ochanda, J.O., Syuto, B., Ohishi, I., Naiki, M., and Shuichiro, K. (1986). Binding of Clostridium botulinum neurotoxin to gangliosides. *J. Biochem. (Tokyo)* *100*, 27–33.
- Perin, M.S., Brose, N., Jahn, R., and Südhof, T.C. (1991). Domain structure of synaptotagmin (p65). *J. Biol. Chem.* *266*, 623–629.
- Rigaud, J.-L., and Lévy, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* *372*, 65–86.
- Rossetto, O., Megighian, A., Scorzeto, M., and Montecucco, C. (2013). Botulinum neurotoxins. *Toxicon* *67*, 31–36.
- Rummel, A. (2015). The long journey of botulinum neurotoxins into the synapse. *Toxicon* *107*, 9–24.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. (2003a). The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction: Ganglioside binding of botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* *51*, 631–643.
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H., and Binz, T. (2003b). Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J. Mol. Biol.* *326*, 835–847.
- Schivell, A.E., Mochida, S., Kensel-Hammes, P., Custer, K.L., and Bajjalieh, S.M. (2005). SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol. Cell. Neurosci.* *29*, 56–64.
- Sonnino, S., Aureli, M., Loberto, N., Chigorno, V., and Prinetti, A. (2010). Fine tuning of cell functions through remodeling of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycohydrolases. *FEBS Lett.* *584*, 1914–1922.
- Stenmark, P., Dupuy, J., Imamura, A., Kiso, M., and Stevens, R.C. (2008). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog.* *4*, e1000129.

Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2010). Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding. *J. Mol. Biol.* *397*, 1287–1297.

Sun, S., Suresh, S., Liu, H., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Edwardson, J.M., and Chapman, E.R. (2011). Receptor Binding Enables Botulinum Neurotoxin B to Sense Low pH for Translocation Channel Assembly. *Cell Host Microbe* *10*, 237–247.

Walton, K.M., Sandberg, K., Rogers, T.B., and Schnaar, R.L. (1988). Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* *263*, 2055–2063.

Yowler, B.C. (2002). Botulinum Neurotoxin A Activity Is Dependent upon the Presence of Specific Gangliosides in Neuroblastoma Cells Expressing Synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* *277*, 32815–32819.

Yowler, B.C., and Schengrund, C.-L. (2004). Botulinum Neurotoxin A Changes Conformation upon Binding to Ganglioside GT1b[†]. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 9725–9731.

DONNEES SUPPLEMENTAIRES

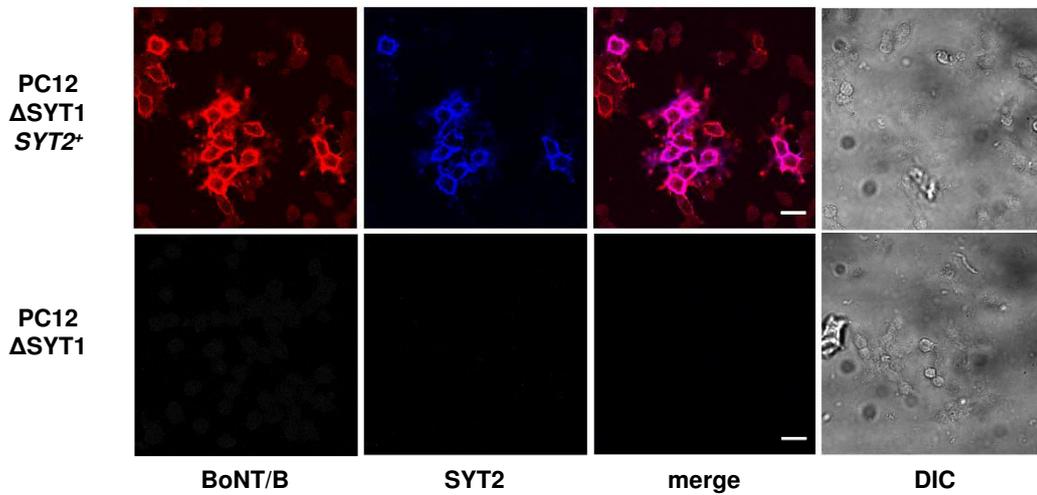


Figure S1 : Détection en immunofluorescence de la BoNT/B liée à la SYT2 transfectée dans les cellules PC12. Colonne de gauche (Anti-BoNT/B) : Détection en immunofluorescence de la BoNT/B (5 nM) liée sur des cellules PC12 transfectées (PC12 Δ SYT1 SYT2⁺) ou non (PC12 Δ SYT1) avec un plasmide codant pour la SYT2. Deuxième colonne (Anti-SYT2): Détection en immunofluorescence de la SYT2 exprimée dans les cellules PC12 Δ SYT1 SYT2⁺ et PC12 Δ SYT1. Troisième colonne (merge): fusion des signaux de marquage de la première (Anti-BoNT/B) et seconde colonne (Anti-SYT2). Les images de cellules en contraste de phase correspondant aux différentes conditions sont affichées dans la colonne de droite (DIC). La SYT2 est détectée uniquement pour les cellules PC12 Δ SYT1 SYT2⁺. La liaison de la BoNT/B est clairement décelée à la surface des cellules exprimant la SYT2, mais pas pour les cellules PC12 Δ SYT1 n'exprimant pas la SYT. La colocalisation de la SYT2 et de la BoNT/B est bien visible (merge) à la surface des cellules PC12 Δ SYT1 SYT2⁺ (barre d'échelle = 15 μ m).

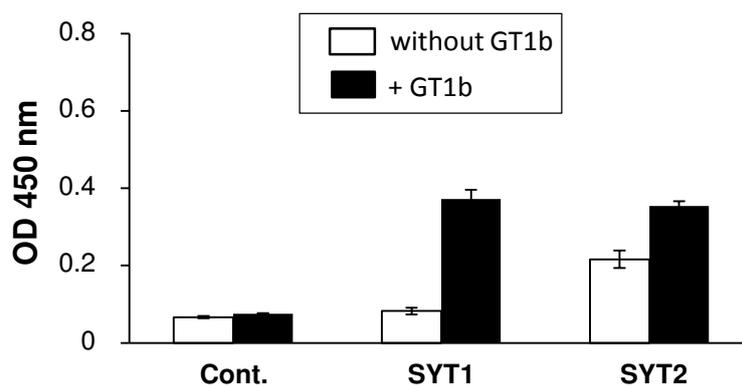


Figure S2: Détection d'interaction entre la H_{cd}/B et les exoSYT1 ou exoSYT2 en ELISA. Des exosomes exprimant la SYT1 (SYT1), la SYT2 (SYT2) ou issus de cellules non transfectées (Cont.) ont été déposés directement sur microplaque puis chargés avec du GT1b avant d'être incubés avec la H_{cd}/B (10 nM). La liaison de la H_{cd}/B a été révélée via un anticorps anti-BoNT/B. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

DISCUSSION

Adressage de protéines membranaires dans les exosomes

Les récepteurs membranaires représentent une part très importante des cibles des médicaments (Yildirim et al., 2007). Les tests évaluant la liaison de ces médicaments sur des récepteurs membranaires, étape déterminante pour initier une réponse pharmacologique, sont essentiels pour le développement de nouveaux médicaments (Pan et al., 2013). Cependant la mise en place de tests *in vitro* quantifiant la liaison de ligands sur des cibles présentées dans un contexte membranaire, peut s'avérer très laborieuse. En effet, cela nécessite d'obtenir une quantité suffisante de récepteurs au plus proche de leur état natif, ce qui représente un vrai défi lorsque le récepteur d'intérêt possède plusieurs domaines transmembranaires et qu'il est peu représenté dans les membranes natives.

En 2009, le groupe de R. Mamoun et M. Vidal avait montré qu'un domaine de la protéine Env du virus de la leucémie bovine induisait l'adressage exosomal d'un peptide correspondant à l'ecodomaine de la protéine CD8 (De Gassart et al., 2009). Lors de notre première étude (Desplantes et al., 2017), nous avons présenté une nouvelle technique permettant de produire des récepteurs membranaires avec une conformation native dans des exosomes en utilisant un peptide d'adressage dérivé du domaine de la protéine Env initialement décrit par A. De Gassart et ses collaborateurs. La méthode d'expression que nous avons employée repose sur le couplage d'un peptide cytosoluble (DCTM) en position C-terminale de la protéine exprimée. Nous avons ainsi pu exprimer dans des cellules d'origine humaine (HEK) des protéines comprenant 1 (SYT), 7 (CXCR4) voire 12 segments transmembranaires (SV2A) mais aussi un canal potassique tétramérique dont chacune des sous-unités possède 6 domaines transmembranaires. Ces PMIs ont une orientation homogène, identique à celle qui est trouvée dans la membrane plasmique et lient des ligands spécifiques.

L'état de glycosylation des récepteurs exprimés dans les exosomes et surtout leur interaction avec des ligands conformationnels indiquent que ces récepteurs présentent des caractéristiques similaires à ceux retrouvés à l'état natif. Nous avons, en effet, mis en évidence que la SYT, la protéine SV2 et le canal potassique étaient glycosylés. De plus, le GPCR CXCR4, ainsi que le canal potassique voltage dépendant Kv1.2 interagissent spécifiquement avec des ligands conformation/assemblage dépendants. Le canal Kv1 étant

tétramérique, l'interaction spécifique de la dendrotoxine avec les exoKv1.2 confirme son état homo-tétramérique (Stühmer et al., 1989; Dolly et al., 1994) à la surface des exosomes.

D'un point de vue quantitatif, nous avons montré que la présence du peptide DCTM augmente l'expression exosomale d'un facteur proche de 10 dans le cas du GPCR CXCR4, mais n'avons pas évalué systématiquement ce facteur pour l'ensemble des récepteurs surexprimés. Nous avons pu estimer à environ 200 le nombre de copies de récepteurs exprimés pour deux types d'exosomes recombinants, soit les exoSYT2 et les exoCXCR4. A titre de comparaison, une stratégie d'exosome display employant une surexpression virale du récepteur de la somatostatine sans peptide d'adressage aboutit à un moindre enrichissement dans les exosomes avec seulement 10 à 30 copies estimée par vésicule (Estelles et al., 2007). Ainsi, même si le fait de surexprimer simplement une protéine dans un système cellulaire peut suffire pour retrouver un contingent de cette protéine exprimée dans le compartiment exosomal, le peptide DCTM induit un enrichissement exosomal important.

Les VEs dans lesquelles nous avons exprimé des protéines membranaires présentent plusieurs critères d'identité exosomale. Toutefois, en l'absence d'un suivi direct des voies intracellulaires impliquées dans la genèse de ces VEs, nos critères de tri et d'identification reposant sur la taille des vésicules, leur densité ou la présence de marqueurs typiquement exosomaux ne nous permettent pas de classer sans ambiguïté les VEs étudiées comme étant des exosomes. Afin d'améliorer l'identification des exosomes, une recherche active est poursuivie de façon à définir de nouvelles méthodes biophysiques ou de nouveaux marqueurs pour différencier les exosomes d'autres VEs membranaires (van der Pol et al., 2016). Dans notre cas, une étude supplémentaire en imagerie ultra structurale pourrait être entreprise pour s'assurer que les protéines recombinantes portant l'étiquette DCTM sont spécifiquement localisées dans des VILs des CMVs avant d'être sécrétées dans l'environnement.

Applications pharmacologiques de la méthode

La méthode d'adressage exosomal que nous avons développé pour les PMIs pourrait avoir des applications dans le domaine biomédical, notamment pour des tests quantitatifs de liaison de drogues ciblant des protéines naturellement exprimées à la surface cellulaire. En pratique, l'utilisation d'exosomes exprimant des récepteurs d'intérêt pharmacologique

est particulièrement intéressante du fait qu'il s'agit d'un matériel biologique stable qui peut être conservé congelé. Une durée de congélation de 3 ans n'a d'ailleurs pas affecté les tests de mesure d'affinité que nous avons réalisés avec la BoNT/B sur des exosomes exprimant la SYT2. Une alternative à la congélation pourrait être la lyophilisation des préparations d'exosomes, comme avec les VSs (Marconi et al., 2008).

Dans le cadre d'un développement de la méthode pour l'industrie pharmaceutique, il serait important de s'assurer de la reproductibilité des lots d'exosomes recombinants que nous avons produits. Une analyse en spectrométrie de masse quantitative pourrait permettre d'établir la composition protéique des différents lots d'exosomes produits et de quantifier le niveau d'expression des récepteurs exogènes exprimés. Il serait aussi important d'évaluer dans quelle mesure l'adressage exosomal d'une PMI exogène impacte la composition protéique des exosomes dans un type cellulaire donné.

Le test SPR présente l'avantage de pouvoir mesurer, en flux, une liaison directe de molécules en absence de marquage. Cependant cette méthode est limitée par le poids moléculaire des analytes injectés. Ainsi, plus le poids moléculaire de la molécule injectée est faible plus la sensibilité de détection est réduite. Néanmoins cet inconvénient lié à la petite taille d'un ligand peut être compensée par l'augmentation du nombre de récepteurs immobilisés. Nous avons pu mesurer sans difficultés la liaison d'un analyte de 8 kDa sur les exosomes exprimant le récepteur CXCR4, ce qui suggère un nombre important de récepteurs à la surface exosomale, estimé à environ 200 par vésicule. Nous pouvons alors extrapoler qu'avec la technique SPR il serait possible de détecter la fixation de ligands autour de 2-3 kDa. Pour les molécules de taille inférieure comme le Levetiracetam, ligand de SV2 possédant un poids moléculaire de 170 Da, des expériences de compétition entre ces molécules de petites tailles et d'autres ligands de taille plus importante pourraient être envisagées. En parallèle des techniques d'ELISA, de SPR et de filtration qui ont été utilisées pour mesurer la liaison de ligands sur les exosomes, d'autres méthodes peuvent être envisagées. Par exemple, des tests de liaison sur les exosomes recombinants pourraient être effectués avec des ligands fluorescents.

Applications potentielle de la méthode pour un contrôle qualité et le développement de BoNTs produites par l'industrie

La BoNT/B comme la BoNT/A sont produites par l'industrie à des fins cosmétiques et thérapeutiques. Les récepteurs protéiques des BoNT/A et B sont majoritairement exprimés nativement dans les VSs avec une orientation des domaines de liaison « inside-in », ce qui ne permet pas de mesurer la liaison de ces toxines à partir de ce type de vésicules. D'autre part, les données actuelles montrent que les affinités des BoNT/A et B mesurées avec les récepteurs sous forme de protéines de fusion, sont beaucoup plus faibles que celles mesurées sur des synaptosomes représentant des terminaisons synaptiques natives. La stratégie d'expression exosomale nous est alors apparue comme particulièrement pertinente du fait que les récepteurs SYT et SV2 soient présentés de façon inversée par rapport aux VSs, c'est-à-dire en « inside-out » avec le domaine intraluminal de ces protéines du côté extravésiculaire, donc accessible pour des études de liaison.

En utilisant des exoSYT, nous avons pu déterminer une affinité de 0.6 nM pour la BoNT/B ce qui correspond à la valeur mesurée dans les terminaisons nerveuses. Notre étude a permis, pour la première fois, de déterminer les paramètres cinétiques de cette liaison avec un k_{on} de $2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et un k_{off} de $1.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Ces constantes avaient été mesurées pour la liaison de la BoNT/A sur des synaptosomes de cerveau de rat en utilisant une toxine radioactive (Dolly 1982). Dans ce cas, les constantes cinétiques trouvées étaient quasi-identiques ($k_{on} = 2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{off} = 1.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) à celles que nous avons déterminées pour la BoNT/B sur les exosomes exprimant la SYT2.

La glycosylation de SV2 est un paramètre important pour la liaison des BoNT/A et E (Chai et al., 2006; Dong et al., 2008). En effet, la faible affinité de la BoNT/A pour une protéine recombinante correspondant à la boucle L4 de SV2 peut être augmentée d'un facteur 10 si le domaine L4 est glycosylé (Mahrhold et al., 2016). Nos premiers résultats en ELISA confirment que la BoNT/A se fixe bien sur les exosomes SV2. Il sera intéressant de mesurer l'affinité de la BoNT/A et de la BoNT/E sur les exosomes SV2A, afin de savoir si elle se rapproche de celle trouvée sur des terminaisons synaptiques (0.4 nM).

Alors qu'il existe plusieurs méthodes très sensibles pour mesurer l'activité enzymatique des BoNTs (Ferracci et al., 2011; Lévêque et al., 2015; Rosen et al., 2016; Wild et al., 2016), il n'existe pas encore de tests simples pour quantifier la liaison et

l'internalisation de la toxine. En outre, l'approche SPR est automatisable et pourrait être utilisée dans l'industrie pour valider des lots pharmaceutiques de BoNT dans leur potentiel d'interaction avec leurs récepteurs. Ces tests *in vitro*, combinés à des tests cellulaires pourraient permettre de diminuer l'utilisation des tests *in vivo* pratiqués encore actuellement chez la souris.

Alors que les affinités des BoNT/A et B sont en général déterminées sur des isoformes de récepteurs de rat et que les tests de mesure d'activité chez l'animal se font chez la souris il serait utile de développer des tests de liaison *in vitro* avec des récepteurs humains. En effet, il a été montré que la BoNT/B possédait moins d'affinité pour la SYT2 humaine que pour son homologue chez le rat (Peng et al., 2012). Il serait intéressant de comparer l'affinité de la BoNT/B pour la SYT1 et la SYT2 humaine, soit individuellement via des expressions exosomales simples, soit en mettant au point une co-expression exosomale des deux isoformes dans l'éventualité d'un hétéro-dimères de SYT (Osborne et al., 1999). De façon similaire, comme SYT et SV2 s'associent dans la membrane des VSs, il serait intéressant de co-transfecter les deux protéines de façon à mesurer l'affinité de la BoNT/B et de la BoNT/A sur un potentiel hétérodimère SYT/SV2 exosomal. Aussi, il serait intéressant de comparer les affinités des différents sous-types de BoNT/B sur des exosomes exprimant la SYT2.

Un axe de recherche concernant l'utilisation des BoNTs à des fins thérapeutiques se tourne vers des toxines natives, recombinantes et/ou chimériques plus actives, plus sélectives ou possédant des spécificités de ciblage différentes. En effet, il a été montré que la combinaison de la chaîne lourde de la BoNT/B avec le domaine de translocation et le domaine portant l'activité catalytique de la BoNT/A permettait d'obtenir une toxine qui se fixe mieux sur les terminaisons que la BoNT/A non modifiée (Wang et al., 2012). Et pour cause la SYT est plus représentée dans les VSs que la SV2 avec un nombre de copies proche de 20 contre 2 ou 5 pour la SV2 (Takamori et al., 2006). Un nombre de sites plus élevé permettrait une entrée plus importante de la toxine chimérique qui développe par la suite une activité persistante, caractéristique de la BoNT/A. Sachant que la BoNT/B a plus d'effets secondaires sur le système nerveux autonome que la BoNT/A (Lew et al., 2000; Connan et al., 2017), ce type de neurotoxine chimérique devrait avoir plus d'effet sur d'autres cibles que les motoneurones.

Autres applications pour les BoNTs

Le mécanisme de translocation des BoNTs liées sur leurs récepteurs dans la lumière des vésicules est difficile à étudier *in vitro*. Le groupe de C. Montecucco a reproduit ce phénomène en acidifiant le pH à la surface des neurones pour faire pénétrer la BoNT/B préalablement fixée sur des neurones (Pirazzini et al., 2011). Cette acidification mime alors le pH acide rencontré par la toxine dans les VSs. A partir du test de liaison que nous avons développé avec les exosomes exprimant la SYT ou la SV2, et dans le but d'étudier les propriétés de translocation de la toxine, il serait intéressant de suivre après interaction, l'éventuelle translocation des BoNTs à travers la membrane exosomale par acidification du milieu. Dans le cas où la LC/B pénétrerait effectivement dans la lumière vésiculaire, la co-expression de la protéine VAMP dans les exosomes pourrait permettre d'associer en un seul test l'étude des trois principales propriétés des BoNTs nécessaires à leur fonction : interaction avec le récepteur membranaire, translocation et clivage du substrat.

Une autre application de cette expression exosomale pourrait concerner la détection d'auto-anticorps circulants dirigés contre des protéines de la surface cellulaire. Un format de test avec des exosomes recombinants marqués avec un marqueur lipidique fluorescent serait adapté à une mesure sensible de liaison d'anticorps présents dans le sérum de patients. Il serait particulièrement intéressant de détecter la présence d'auto-anticorps anti SYT présent chez certains patients atteints du syndrome myasthénique de Lambert-Eaton (Leveque et al., 1992; Takamori et al., 1994).

Enfin et de manière générale, le test de liaison utilisant des exosomes pourrait aussi être utile pour la recherche et la caractérisation en SPR ou en ELISA, de molécules inhibitrices de la liaison de BoNT/A ou B sur leurs récepteurs comme des anticorps séro-neutralisant.

Application pour la production d'anticorps

La production d'anticorps dirigés contre des protéines membranaires dans leur contexte natif représente un intérêt majeur dans la recherche clinique aussi bien pour des applications de diagnostic que des applications thérapeutiques comme l'immunothérapie et l'adressage ciblé de drogues spécifiques. Or, pour des raisons de présentation inappropriée de l'antigène il est souvent difficile d'obtenir des anticorps spécifiques de haute affinité

(Hamakubo et al., 2014). En effet, les anticorps les plus spécifiques et efficaces sont généralement des anticorps conformationnels dont la production requiert la conformation tri-dimensionnelle de la protéine cible. L'injection d'exosomes recombinants exprimant des protéines membranaires pourrait représenter une nouvelle approche fortement immunogénique (Pitt et al., 2016) pour obtenir ce type d'anticorps.

Application de vectorisation

Les exosomes jouent vraisemblablement un rôle de messagers intercellulaire en situation physiologique comme dans certaines conditions physiopathologiques. Par conséquent, ils représentent un outil attractif pour le développement de nouvelles applications thérapeutiques. Les exosomes sont capables de vectoriser des molécules fonctionnelles dans des cellules réceptrices sous forme de protéine, ou d'acide nucléiques (Valadi et al., 2007) et plusieurs stratégies ont déjà été utilisées pour adresser des molécules d'intérêt thérapeutique dans la lumière des exosomes (Alvarez-Erviti et al., 2011; Yim, 2016). Le mode d'entrée des exosomes dans les cellules cibles est encore mal connu. Il pourrait être plus ou moins spécifique en fonction de la cellule « donneuse » sécrétrice d'exosome ou réceptrice. Afin de cibler le récepteur nicotinique de l'acétylcholine et s'assurer d'une certaine spécificité d'adressage, des modifications des protéines exosomales de surface ont récemment été tentées (Alvarez-Erviti et al., 2011; Ohno et al., 2013; Tian et al., 2014). La technologie CILOA pourrait permettre de lier une molécule d'adressage spécifique à la surface de l'exosome comme une protéine membranaire ou un anticorps.

Etude de la liaison de la BoNT/B dans un contexte membranaire

Les données structurales montrent que la BoNT/B possède dans sa partie H_{CC} deux poches de liaison distinctes permettant d'accueillir à la fois le GT1b et la SYT (Berntsson et al., 2013). Le modèle de liaison couramment accepté consiste en une liaison séquentielle de la BoNT sur ce double récepteur, précédant l'internalisation neuronale du complexe ternaire (Rummel, 2015). Selon ce modèle, la BoNT/B serait concentrée au niveau la membrane présynaptique via une première liaison de faible affinité avec le GT1b, ganglioside présent en abondance dans les terminaisons nerveuses (Sonnino et al., 2010), puis formerait un

complexe ternaire stable consécutivement à une seconde liaison de haute affinité avec la SYT (Montecucco, 1986).

L'interaction de la BoNT/B avec chacun de ses récepteurs a été décrite dans la littérature, le plus souvent avec des partenaires purifiés sous forme soluble. En tenant compte de l'importance que peut avoir l'environnement membranaire de ces récepteurs, les résultats de notre seconde étude (**article 2**) ont permis de revisiter individuellement les interactions de la BoNT/B avec ses deux récepteurs insérés dans des membranes biologiques. Ainsi, nos conclusions confortent l'idée que la BoNT/B possède une affinité très faible pour le GT1b membranaire. D'autre part, nous avons déterminé que la BoNT/B a une affinité de 40 nM pour la SYT2 insérée dans une membrane. Des expériences *in vivo* menées chez des souris déficientes en gangliosides ont montré que la BoNT/B demeurait toxique pour ces animaux, mais pour des concentrations plus élevées comparé aux animaux témoins (Kitamura et al., 1999). Dans une autre étude utilisant des préparations nerf-muscle, il a été rapporté que la toxicité de la BoNT/B était diminuée d'un facteur 100 chez les souris déficientes en gangliosides par rapport aux souris sauvages (Rummel et al., 2007). Nos résultats montrant que l'absence de gangliosides associé à la SYT2 induit une perte d'affinité de la BoNT/B d'un facteur 65 par rapport à des conditions où le GT1b est présent, est en accord avec la perte de sensibilité à la BoNT/B observé chez les souris déficientes en gangliosides.

Les ganqliosides seuls ne constitueraient pas le premier site de liaison des BoNTs

En regroupant nos données avec celles de la littérature, plusieurs arguments s'opposent à l'hypothèse selon laquelle le GT1b constituerait à proprement dit le récepteur initial de la BoNT/B:

i/ Le GT1b n'est pas exprimé exclusivement dans les terminaisons nerveuses alors que les BoNT ciblent spécifiquement ces dernières.

ii/ Nos résultats montrent que la BoNT/B possède une affinité faible pour le GT1b avec une interaction instable (**article 2**).

iii/ Dans l'hypothèse où le GT1b capturerait la BoNT et que ce complexe migrerait dans le plan de la membrane pour rencontrer la SYT, l'affinité du complexe peut être estimée comme le produit de l'affinité de la BoNT/B pour le GT1b et celle de la BoNT/B pour

la SYT2 (Montecucco, 1986). Ainsi, en admettant que le K_D de la BoNT/B pour le GT1b soit de 200 nM (Kohda et al., 2007; Yowler and Schengrund, 2004b), le K_D de la BoNT/B pour la SYT étant de 40 nM, le K_D théorique de la BoNT/B pour le double récepteur serait de $200 \times 10^{-9} \times 40 \times 10^{-9} = 8 \times 10^{-15}$ M (80 femto molaire). Cependant, cette affinité quasi-irréversible n'a jamais été observée et n'est pas en adéquation avec les affinités mesurées sur des récepteurs recombinants ou natifs et qui varient entre 0.2 et 4 nM (Evans et al., 1986; Nishiki et al., 1996a; Bakry et al., 1997; Desplantes et al., 2017).

iv/ Nos données de SPR obtenues avec des exoSYT2/GT1b sont en adéquation avec un modèle d'interaction 1:1, suggérant que la toxine ne reconnaît qu'un seul site (Desplantes et al., 2017).

v/ L'interaction de la BoNT/B avec le GT1b n'a jamais pu être mise en évidence sur des préparations sub-cellulaires ou cellulaires contrairement à d'autres toxines comme la toxine cholérique dont le GM1 est le récepteur (Blank et al., 2007). La liaison de BoNT/B sur des synaptosomes de cerveau de rat révèle deux types de sites de fixation. Le premier minoritaire et de forte affinité, de l'ordre de 0.5 nM, et le second de plus faible affinité entre 8 et plus de 20 nM (Evans et al., 1986; Nishiki et al., 1993), avec une densité de sites 5 à 10 fois supérieure. La SYT1 étant plus fortement exprimée dans le cerveau de rat que la SYT2, le groupe de S. Kozaki a suggéré que ces sites de haute et basse affinité correspondaient respectivement aux récepteurs SYT2/GT1b et SYT1/GT1b, plutôt qu'à la SYT/GT1b et aux gangliosides seuls comme cela a pu être interprété (Rummel et al., 2009). Nos données sont en adéquation avec cette proposition étant donné que nous n'avons pas observé d'interaction entre le GT1b et la BoNT/B pour des concentrations de toxine de l'ordre du nanomolaire en utilisant des techniques nécessitant plusieurs lavages.

vi/ Il a été mis en évidence que des mutations ponctuelles de la BoNT/B peuvent affecter la liaison de cette dernière sur le GT1b sans moduler sa liaison au double récepteur (Kohda et al., 2007). Inversement, des mutations dans la poche de liaison au GT1b de la BoNT/B qui affectent la liaison de la toxine au complexe SYT2-GT1b diminuent la capacité de la BoNT/B à bloquer la libération de neurotransmetteur (Kohda et al., 2007). Ce travail montre indirectement que l'étape initiale de reconnaissance des terminaisons nerveuses ne passe pas par une reconnaissance du GT1b mais plutôt par une reconnaissance du complexe SYT2-GT1b.

Toutefois, bien que les gangliosides ne constituent vraisemblablement pas à eux seuls des sites récepteurs indépendants pour la BoNT/B, ils pourraient néanmoins jouer un rôle non négligeable d'attracteurs électrostatiques pour favoriser cette interaction. Ainsi, comme proposé par C. Montecucco (Fogolari et al., 2009), la BoNT/B serait attirée et concentrée localement par un champ électrostatique constitué par les charges négatives globales provenant à la fois des gangliosides et des sulfatides à la surface des zones non myelinisées des terminaisons nerveuses. De plus, les charges positives de la partie H_{CC} de la BoNT orienterait la toxine correctement par rapport au double récepteur alors que la charge globale négative de la neurotoxine induirait une orientation perpendiculaire de la H_N par rapport au plan membranaire (Fogolari et al., 2009; Pirazzini et al., 2017).

Importance de l'interaction SYT-GT1b pour la liaison des BoNTs

Les données expérimentales de l'article 2 montrent que la SYT2 interagit directement avec le GT1b par son domaine extracellulaire juxtamembranaire. De manière cohérente, nos données de modélisation moléculaire le confirment, et précisent que la SYT interagirait aussi avec la partie céramide du ganglioside. Il faut noter qu'une interaction entre le domaine transmembranaire de la SYT et le GT1b avait été suggérée précédemment (Kozaki 1998) sans que cette donnée puisse être confirmée par d'autres laboratoires. Il y a presque 20 ans ce groupe postulait alors que les deux co-récepteurs pouvaient former un complexe préassemblé pour ensuite lier la BoNT/B.

Les glycolipides et en particulier les gangliosides ne sont pas distribués de façon uniforme dans la membrane et sont regroupés au sein de domaines qui participent et modulent la transduction des signaux (Schnaar, 2016). Ils sont probablement très représentés dans les régions membranaires où se produisent l'exocytose et l'endocytose, restreintes à certains microdomaines. De manière intéressante, le GT1b, qui possède la tête polaire la plus proéminente de tous les gangliosides, pourrait favoriser la formation d'une courbure membranaire positive (Rohrbough and Broadie, 2005) notamment aux abords des sites d'endocytose pour faciliter la formation d'une vésicule depuis la membrane plasmique. Par ailleurs, il a été montré que la BoNT/B, comme la SYT, étaient associées à des domaines membranaires spécialisés de type radeau lipidique enrichis en cholestérol, gangliosides et protéines GPI-ancrées (Lalli et al., 1999; Thiele et al., 2000; Herreros and Schiavo, 2002; Gil et al., 2005; Lv et al., 2008). En supposant qu'au sein de ces domaines, l'interaction SYT-

GT1b soit impliquée positivement dans le mécanisme d'endocytose des VSs, il est probable que les BoNTs, par leur reconnaissance du double récepteur en complexe sélectionnent une voie préférentielle d'internalisation neuronale. Dans l'hypothèse alternative où l'interaction de la SYT avec le GT1b ne serait pas liée à l'endocytose, la BoNT/B devrait rester associée au double récepteur le temps que celui-ci soit internalisé. D'après la mesure du k_{off} de la BoNT/B sur le complexe SYT-GT1b (**tableau1**) (Desplantes et al., 2017), le complexe ternaire BoNT/B- GT1b-SYT2 posséderait une durée de demi-vie de plus d'1 heure, ce qui représente une fenêtre temporelle très large vis-à-vis de l'endocytose.

Dans le modèle que nous proposons (**Figure 52**), suite à la fusion des VSs, la SYT se retrouverait au sein de la membrane plasmique dans un environnement très riche en GT1b. Ceci permettrait une interaction quasi-instantanée de la protéine avec le ganglioside, à la fois par son domaine transmembranaire (Kozaki et al., 1998b) et par sa partie juxtamembranaire extracellulaire (**article 2**). Il est aussi possible que les molécules de GT1b agissent comme une barrière de diffusion à l'instar de ce qui se passe au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique où la syntaxine est restreinte en patch avec le PIP2 dans les sites d'exocytose (Martin, 2015).

Alors que le domaine juxtamembranaire de la SYT ne présente pas spontanément de structure secondaire (**Jin 2006**), ce domaine est structuré hélice α une fois en complexe avec la SYT et le GT1b. L'interaction de la SYT avec le GT1b pourrait induire la formation d'une structure en hélice α favorable à la liaison de la BoNT/B. Une hypothèse intéressante serait que la formation de cette hélice amphipathique serait importante pour présenter et concentrer face à la BoNT/B les résidus apolaires cruciaux pour cette interaction. Une analyse en dichroïsme circulaire permettrait d'examiner si le GT1b peut influencer la structure secondaire du domaine juxtamembranaire de la SYT, et éventuellement induire une transition conformationnelle vers une hélice α .

En somme, dans l'hypothèse de la participation des gangliosides à la structuration du domaine juxtamembranaire de la SYT, les molécules de GT1b auraient un triple rôle : attraction/concentration de la BoNT/B sur la membrane présynaptique, présentation de la SYT dans une conformation favorable à la liaison de la BoNT/B et consolidation de cette interaction en occupant une poche spécifique de la neurotoxine.

La SYT ne peut lier à la fois la BoNT/B et le ganglioside

Les principaux acides aminés impliqués dans l'interaction entre la SYT et le GT1b sont aussi impliqués dans l'interaction avec la BoNT/B, notamment la Phe₅₄ qui joue un rôle central dans ces interactions ainsi que la Glu₅₇ et Ile₅₈ (**article 2, Fig. S3**). Ainsi, des interactions mutuellement exclusives ont lieu entre la SYT et la BoNT/B d'une part et la SYT et le ganglioside d'autre part. De ce fait, une dissociation de l'interaction SYT/GT1b est nécessaire afin de permettre l'interaction avec la BoNT/B. La liaison de la BoNT/B sur la SYT déplacerait le GT1b pré-associé à cette dernière, lui permettant alors de se positionner seule dans la poche de liaison dédiée de la BoNT/B. La molécule de GT1b ainsi libérée, ou bien une autre molécule présente dans l'environnement proche du complexe, se lierait dans le même temps dans la poche de liaison au GT1b de la toxine, distante de 15 Angström de celle accueillant la SYT. Cette double interaction sous-tendrait l'affinité d'environ 0.5 nM mesurée pour la BoNT/B.

Un double récepteur permanent ou transitoire ?

Il a été postulé depuis longtemps que l'exposition de la SYT à la surface de la cellule n'était que transitoire car associée au cycle des VSs. Bien que la majorité des protéines vésiculaires soit endocytée après la fusion des VSs à la membrane plasmique, il devient de plus en plus clair qu'il existe une population non négligeable de SYT à la membrane plasmique et que l'endocytose de ce pool n'est pas forcément liée à l'exocytose des VSs. La concentration de SYT à la surface des cellules pourrait être 10 fois inférieure à celle trouvée dans les vésicules synaptiques (Fernández-Alfonso et al., 2006) où sa concentration avoisine les 100 μ M à raison de 20 copies par VS (Takamori et al., 2006). Des données ultrastructurales et d'imagerie démontrent que la SYT est détectable à la membrane plasmique sous forme de patch (Takahashi et al., 1991; Wienisch and Klingauf, 2006; Willig et al., 2006). La présence d'une population résidente de SYT à la membrane plasmique est aussi attestée par des données montrant que la BoNT/B peut se lier et entrer dans des neurones traités avec la BoNT/A c'est à dire dans des conditions où il n'y a plus d'apport de SYT à la membrane plasmique (Pellett et al., 2015). Si l'on considère l'association avec le GT1b, ce contingent de SYT pourrait constituer une réserve constante de récepteurs suffisante pour accrocher la BoNT/B présente dans la circulation sanguine à très faible

concentrations. Ceci est en accord avec des observations ultra structurales montrant au repos une densité importante de sites de fixation de BoNT/B (environ 600 sites/um²) au niveau des jonctions neuro musculaires de souris (Black and Dolly, 1986). Cette abondance de sites récepteurs pourrait être déterminante dans l'intoxication. En effet, d'après les calculs théoriques, une seule molécule de BoNT internalisée peut produire l'inactivation d'une terminaison axonale (Foran et al., 1994).

Proposition d'un nouveau modèle pour la liaison des BoNTs

En conclusion, nos résultats montrent que :

- 1/ La BoNT/B interagit très transitoirement avec le GT1b et ce avec une faible affinité
- 2/ La BoNT/B peut reconnaître la SYT2 dans un contexte membranaire
- 3/ la présence de GT1b augmente l'affinité de la BoNT/B pour la SYT essentiellement en augmentant le k_{on} pour créer un seul et unique site de haute affinité
- 4/ la SYT interagit directement avec le GT1b par son domaine extracellulaire et juxtamembranaire, une interaction ayant potentiellement des conséquences conformationnelles sur la SYT.

L'ensemble de ces données nous permettent de proposer que la reconnaissance des récepteurs neuronaux par la BoNT/B passe par une interaction avec un complexe récepteur SYT-GT1b pré-assemblé plutôt que par le GT1b ou la SYT seule (**Figure 52**).

Autres perspectives d'études

En outre, l'interaction de la SYT par son domaine cytoplasmique avec les lipides du feuillet interne de la membrane plasmique a fait l'objet de nombreuses investigations car cette protéine joue un rôle clef dans la régulation de l'exocytose. Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence que la SYT interagissait aussi avec des lipides du côté extracellulaire. En considérant que cette interaction n'a naturellement pas été mise en place par le neurone pour favoriser la pénétration des BoNTs, cette découverte ouvre des perspectives dépassant les problématiques des neurotoxines botuliques avec une interrogation sur son rôle physiologique. Il apparaît alors pertinent d'étudier l'importance de cette interaction dans les rôles déjà décrits de la SYT et notamment dans la régulation du mécanisme d'endocytose.

Figure 52 : Proposition de modèle de liaison de la BoNT/B sur son double récepteur. Après exocytose, la SYT exposée à la membrane plasmique diffuse (1) et rencontre une molécule de GT1b. L'association de la SYT et du GT1b (2) forme le complexe récepteur de haute affinité reconnu par la BoNT/B. Le GT1b induirait la formation d'une hélice α au niveau de la partie juxtamembranaire du domaine extracellulaire de la SYT, ce qui préparerait la SYT à lier la BoNT/B. Lors de la liaison de la BoNT/B (3), la neurotoxine dissocierait le GT1b de la SYT au niveau de son domaine extracellulaire. De façon simultanée, la molécule de GT1b dissociée de la SYT, ou une autre molécule de GT1b, irait se loger dans la poche de liaison de la BoNT/B dédiée aux gangliosides. Une fois formé, le complexe ternaire est endocyté (4) au niveau de domaines spécialisés. Il est probable qu'au sein de ces domaines des molécules de GT1b participent à l'endocytose en favorisant une courbure membranaire positive aux abords du domaine membranaire invaginé.

BIBLIOGRAPHIE

- Aalberts, M., Stout, T.A.E., and Stoorvogel, W. (2013). Protasomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction* 147, R1–R14.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., and Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628.
- Abrams, S.B., and Hallett, M. (2013). Clinical utility of different botulinum neurotoxin preparations. *Toxicon* 67, 81–86.
- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filen, J.-J., Laheesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *J. Immunol.* 179, 1969–1978.
- Al-Saleem, F.H., Ancharski, D.M., Joshi, S.G., Elias, M., Singh, A., Nasser, Z., and Simpson, L.L. (2012). Analysis of the Mechanisms That Underlie Absorption of Botulinum Toxin by the Inhalation Route. *Infect. Immun.* 80, 4133–4142.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., and Wood, M.J.A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29, 341–345.
- Anderson, R.G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199–225.
- Andre, F., Chaput, N., Scharz, N.E.C., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D.-H., et al. (2004). Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. I. Dendritic Cell-Derived Exosomes Transfer Functional MHC Class I/Peptide Complexes to Dendritic Cells. *J. Immunol.* 172, 2126–2136.
- ANSES (2011). Fiche de description de danger microbien transmissible par les aliments.
- Argoff, C.E. (2002). A focused review on the use of botulinum toxins for neuropathic pain. *Clin. J. Pain* 18, S177-181.
- Arita, S., Baba, E., Shibata, Y., Niino, H., Shimoda, S., Isobe, T., Kusaba, H., Nakano, S., and Harada, M. (2008). B cell activation regulates exosomal HLA production. *Eur. J. Immunol.* 38, 1423–1434.
- Arndt, J.W., Jacobson, M.J., Abola, E.E., Forsyth, C.M., Tepp, W.H., Marks, J.D., Johnson, E.A., and Stevens, R.C. (2006). A Structural Perspective of the Sequence Variability Within Botulinum Neurotoxin Subtypes A1-A4. *J. Mol. Biol.* 362, 733–742.
- Arnon, S.S., Midura, T.F., Clay, S.A., Wood, R.M., and Chin, J. (1977). Infant botulism. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects. *JAMA* 237, 1946–1951.
- Arnon, S.S., Schechter, R., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Hauer, J., Layton, M., et al. (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 285, 1059–1070.
- Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I.M., Skupski, D., and Witkin, S.S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J. Reprod. Immunol.* 79, 12–17.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3, 283–289.

- Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* *162*, 435–442.
- Bache, K.G., Slagsvold, T., Cabezas, A., Rosendal, K.R., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2004). The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation. *Mol. Biol. Cell* *15*, 4337–4346.
- Bade, S., Rummel, A., Reisinger, C., Karnath, T., Ahnert-Hilger, G., Bigalke, H., and Binz, T. (2004). Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates: BoNT/D enables enzyme delivery to the cytosol. *J. Neurochem.* *91*, 1461–1472.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., et al. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* *14*, 677–685.
- Bajjalieh, S.M., Peterson, K., Shinghal, R., and Scheller, R.H. (1992). SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science* *257*, 1271–1273.
- Bajjalieh, S.M., Peterson, K., Linial, M., and Scheller, R.H. (1993). Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 2150–2154.
- Bajjalieh, S.M., Frantz, G.D., Weimann, J.M., McConnell, S.K., and Scheller, R.H. (1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neurosci.* *14*, 5223–5235.
- Bakry, N.M., Kamata, Y., and Simpson, L.L. (1997). Expression of botulinum toxin binding sites in *Xenopus* oocytes. *Infect. Immun.* *65*, 2225–2232.
- Ben David, A., Torgeman, A., Barnea, A., and Zichel, R. (2015). Expression, purification and characterization of the receptor-binding domain of botulinum neurotoxin serotype B as a vaccine candidate. *Protein Expr. Purif.* *110*, 122–129.
- Bengtson, I.A. (1922). Preliminary Note on a Toxin-Producing Anaerobe Isolated from the Larvæ of *Lucilia Cæsar*. *Public Health Rep.* 1896-1970 *37*, 164.
- Bengtson, I.A. (1923). A Toxin-Producing Anaerobe Isolated Principally from Fly Larvæ: Its Relation to the Organisms Hitherto Known to Be Causative Factors in the Production of Botulism. *Public Health Rep.* 1896-1970 *38*, 340.
- Benoit, R.M., Frey, D., Hilbert, M., Kevenaar, J.T., Wieser, M.M., Stirnimann, C.U., McMillan, D., Ceska, T., Lebon, F., Jaussi, R., et al. (2013). Structural basis for recognition of synaptic vesicle protein 2C by botulinum neurotoxin A. *Nature* *505*, 108–111.
- Berntsson, R.P.-A., Peng, L., Dong, M., and Stenmark, P. (2013). Structure of dual receptor binding to botulinum neurotoxin B. *Nat. Commun.* *4*.
- Bhandari, M., Campbell, K.D., Collins, M.D., and East, A.K. (1997). Molecular characterization of the clusters of genes encoding the botulinum neurotoxin complex in *Clostridium botulinum* (*Clostridium argentinense*) type G and nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B. *Curr. Microbiol.* *35*, 207–214.
- Binz, T., Kurazono, H., Wille, M., Frevert, J., Wernars, K., and Niemann, H. (1990). The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* *265*, 9153–9158.

- Bkaily, G., Al-Khoury, J., and Jacques, D. (2014). Nuclear membranes GPCRs: implication in cardiovascular health and diseases. *Curr. Vasc. Pharmacol.* *12*, 215–222.
- Black, J.D., and Dolly, J.O. (1986). Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J. Cell Biol.* *103*, 521–534.
- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., and Hivroz, C. (2002). TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ Complex. *J. Immunol.* *168*, 3235–3241.
- Blank, N., Schiller, M., Krienke, S., Wabnitz, G., Ho, A.D., and Lorenz, H.-M. (2007). Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol. Cell Biol.* *85*, 378–382.
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2011). Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic* *12*, 1659–1668.
- Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.-M., Hildreth, J.E.K., and Gould, S.J. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J. Cell Biol.* *172*, 923–935.
- Breidenbach, M.A., and Brunger, A.T. (2004). Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. *Nature* *432*, 925–929.
- Brini, M., Di Leva, F., Ortega, C.K., Domi, T., Ottolini, D., Leonardi, E., Tosatto, S.C.E., and Carafoli, E. (2010). Deletions and Mutations in the Acidic Lipid-binding Region of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump: A STUDY ON DIFFERENT SPLICING VARIANTS OF ISOFORM 2. *J. Biol. Chem.* *285*, 30779–30791.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C., and Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* *256*, 1021–1025.
- Bryant, N.J., and Stevens, T.H. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 230–247.
- Bullens, R.W., O’Hanlon, G.M., Wagner, E., Molenaar, P.C., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, J.J., and Willison, H.J. (2002). Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J. Neurosci.* *22*, 6876–6884.
- Burgen, A.S.V., Dickens, F., and Zatman, L.J. (1949). The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J. Physiol.* *109*, 10–24.
- Burke, G.S. (1919). Notes on *Bacillus botulinus*. *J. Bacteriol.* *4*, 555.
- Byrne, B. (2015). *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *32*, 9–17.
- Caby, M.-P. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* *17*, 879–887.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). Botulism Annual Summary, 2014.
- Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., and Cregg, J.M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* *13*, 329–332.

- Chai, Q., Arndt, J.W., Dong, M., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2006). Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* *444*, 1096–1100.
- Chairoungdua, A., Smith, D.L., Pochard, P., Hull, M., and Caplan, M.J. (2010). Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.* jcb–201002049.
- Chapman, E.R. (2008). How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 615–641.
- Chapman, E.R., Hanson, P.I., An, S., and Jahn, R. (1995). Ca^{2+} regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J. Biol. Chem.* *270*, 23667–23671.
- Chen, S., and Barbieri, J.T. (2009). Engineering botulinum neurotoxin to extend therapeutic intervention. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9180–9184.
- Chen, F., Kuziemko, G.M., Amersdorfer, P., Wong, C., Marks, J.D., and Stevens, R.C. (1997). Antibody mapping to domains of botulinum neurotoxin serotype A in the complexed and uncomplexed forms. *Infect. Immun.* *65*, 1626–1630.
- Cheng, Y., and Schorey, J.S. (2015). Targeting soluble proteins to exosomes using a ubiquitin tag. *Biotechnol. Bioeng.*
- Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M.D., Hobot, J.A., Newman, G.R., and Jasani, B. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* *247*, 163–174.
- Cocucci, E., and Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* *25*, 364–372.
- Colasante, C., Rossetto, O., Morbiato, L., Pirazzini, M., Molgó, J., and Montecucco, C. (2013). Botulinum Neurotoxin Type A is Internalized and Translocated from Small Synaptic Vesicles at the Neuromuscular Junction. *Mol. Neurobiol.* *48*, 120–127.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Thery, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* *126*, 5553–5565.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 255–289.
- Connan, C., Denève, C., Mazuet, C., and Popoff, M.R. (2013). Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Toxicon* *75*, 90–100.
- Connan, C., Varela-Chavez, C., Mazuet, C., Molgó, J., Haustant, G.M., Disson, O., Lecuit, M., Vandewalle, A., and Popoff, M.R. (2016). Translocation and dissemination to target neurons of botulinum neurotoxin type B in the mouse intestinal wall. *Cell. Microbiol.* *18*, 282–301.
- Connan, C., Voillequin, M., Chavez, C.V., Mazuet, C., Leveque, C., Vitry, S., Vandewalle, A., and Popoff, M.R. (2017). Botulinum neurotoxin type B uses a distinct entry pathway mediated by CDC42 into intestinal cells versus neuronal cells. *Cell. Microbiol.*

- Couesnon, A., Pereira, Y., and Popoff, M.R. (2008). Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell. Microbiol.* *10*, 375–387.
- Court, F.A., Midha, R., Cisterna, B.A., Grochmal, J., Shakhbazau, A., Hendriks, W.T., and Van Minnen, J. (2011). Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia* *59*, 1529–1539.
- Crowder, K.M., Gunther, J.M., Jones, T.A., Hale, B.D., Zhang, H.Z., Peterson, M.R., Scheller, R.H., Chavkin, C., and Bajjalieh, S.M. (1999). Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 15268–15273.
- Custer, K.L., Austin, N.S., Sullivan, J.M., and Bajjalieh, S.M. (2006). Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 1303–1313.
- Daniels, V., Wood, M., Leclercq, K., Kaminski, R.M., and Gillard, M. (2013). Modulation of the conformational state of the SV2A protein by an allosteric mechanism as evidenced by ligand binding assays. *Br. J. Pharmacol.* *169*, 1091–1101.
- De Gassart, A. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* *102*, 4336–4344.
- De Gassart, A., Trentin, B., Martin, M., Hocquellet, A., Bettebobillo, P., Mamoun, R., and Vidal, M. (2009). Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein. *Cell Biol. Int.* *33*, 36–48.
- Delcayre, A., Estelles, A., Sperinde, J., Roulon, T., Paz, P., Aguilar, B., Villanueva, J., Khine, S., and Le Pecq, J.-B. (2005). Exosome Display technology: Applications to the development of new diagnostics and therapeutics. *Blood Cells. Mol. Dis.* *35*, 158–168.
- Demirov, D.G., Ono, A., Orenstein, J.M., and Freed, E.O. (2002). Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 955–960.
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W., and Geuze, H.J. (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* *113*, 3365–3374.
- Desplantes, R., Lévêque, C., Muller, B., Lotierzo, M., Ferracci, G., Popoff, M., Seagar, M., Mamoun, R., and El Far, O. (2017). Affinity biosensors using recombinant native membrane proteins displayed on exosomes: application to botulinum neurotoxin B receptor. *Sci. Rep.* *7*.
- Detrait, E., Maurice, T., Hanon, E., Leclercq, K., and Lamberty, Y. (2014). Lack of synaptic vesicle protein SV2B protects against amyloid- β_{25-35} -induced oxidative stress, cholinergic deficit and cognitive impairment in mice. *Behav. Brain Res.* *271*, 277–285.
- Di Giovanni, J., Iborra, C., Maulet, Y., Leveque, C., El Far, O., and Seagar, M. (2010). Calcium-dependent Regulation of SNARE-mediated Membrane Fusion by Calmodulin. *J. Biol. Chem.* *285*, 23665–23675.
- Dolly, J.O., Rettig, J., Scott, V.E., Parcej, D.N., Wittkat, R., Sewing, S., and Pongs, O. (1994). Oligomeric and subunit structures of neuronal voltage-sensitive K⁺ channels. *Biochem. Soc. Trans.* *22*, 473–478.
- Dong, M. (2006). SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* *312*, 592–596.

- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* *162*, 1293–1303.
- Dong, M., Tepp, W.H., Liu, H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2007). Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* *179*, 1511–1522.
- Dong, M., Liu, H., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2008). Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol. Biol. Cell* *19*, 5226–5237.
- Dover, N., Barash, J.R., Hill, K.K., Xie, G., and Arnon, S.S. (2014). Molecular Characterization of a Novel Botulinum Neurotoxin Type H Gene. *J. Infect. Dis.* *209*, 192–202.
- Drachman, D.B., Adams, R.N., Balasubramanian, U., and Lu, Y. (2010). Strategy for Treating Motor Neuron Diseases Using a Fusion Protein of Botulinum Toxin Binding Domain and Streptavidin for Viral Vector Access: Work in Progress. *Toxins* *2*, 2872–2889.
- Dressler, D., and Benecke, R. (2007). Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil. Rehabil.* *29*, 1761–1768.
- Eleopra, R., Tugnoli, V., Rossetto, O., De Grandis, D., and Montecucco, C. (1998). Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. *Neurosci. Lett.* *256*, 135–138.
- Erbguth, F.J. (2004). Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov. Disord.* *19*, S2–S6.
- Erbguth, F.J. (2009). The pretherapeutic history of botulinum toxin. *Man. Botulinum Toxin Ther.* Camb. Univ. Press Camb.
- van Ermengem, E. (1979). Classics in infectious diseases. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. E. van Ermengem. Originally published as “Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus” in *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* *26*: 1-56, 1897. *Rev. Infect. Dis.* *1*, 701–719.
- Estelles, A., Sperinde, J., Roulon, T., Aguilar, B., Bonner, C., LePecq, J., and Delcayre, A. (2007). Exosome nanovesicles displaying G protein-coupled receptors for drug discovery. *Int. J. Nanomedicine* *2*, 751.
- Evans, D.M., Williams, R.S., Shone, C.C., Hambleton, P., Melling, J., and Dolly, J.O. (1986). Botulinum neurotoxin type B. *Eur. J. Biochem.* *154*, 409–416.
- Fader, C.M., Sánchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1793*, 1901–1916.
- Fagerberg, L., Jonasson, K., von Heijne, G., Uhlén, M., and Berglund, L. (2010). Prediction of the human membrane proteome. *PROTEOMICS* *10*, 1141–1149.
- Farooqui, T., Franklin, T., Pearl, D.K., and Yates, A.J. (1997). Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of a putative dimer of TrkA. *J. Neurochem.* *68*, 2348–2355.

- Fauré, 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.
- Feany, M.B., Lee, S., Edwards, R.H., and Buckley, K.M. (1992). The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* *70*, 861–867.
- Fernández-Alfonso, T., Kwan, R., and Ryan, T.A. (2006). Synaptic vesicles interchange their membrane proteins with a large surface reservoir during recycling. *Neuron* *51*, 179–186.
- Ferracci, G., Marconi, S., Mazuet, C., Jover, E., Blanchard, M.-P., Seagar, M., Popoff, M., and Lévêque, C. (2011). A label-free biosensor assay for botulinum neurotoxin B in food and human serum. *Anal. Biochem.* *410*, 281–288.
- Février, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 415–421.
- 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.
- Fischer, A., and Montal, M. (2007a). Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 10447–10452.
- Fischer, A., and Montal, M. (2007b). Crucial Role of the Disulfide Bridge between Botulinum Neurotoxin Light and Heavy Chains in Protease Translocation across Membranes. *J. Biol. Chem.* *282*, 29604–29611.
- Fischer, A., and Montal, M. (2013). Molecular dissection of botulinum neurotoxin reveals interdomain chaperone function. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *75*, 101–107.
- Fischer, A., Garcia-Rodriguez, C., Geren, I., Lou, J., Marks, J.D., Nakagawa, T., and Montal, M. (2008). Molecular Architecture of Botulinum Neurotoxin E Revealed by Single Particle Electron Microscopy. *J. Biol. Chem.* *283*, 3997–4003.
- Fisher, A., and Montal, M. (2006). Characterization of Clostridial botulinum neurotoxin channels in neuroblastoma cells. *Neurotox. Res.* *9*, 93–100.
- Fogolari, F., Tosatto, S.C.E., Muraro, L., and Montecucco, C. (2009). Electric dipole reorientation in the interaction of botulinum neurotoxins with neuronal membranes. *FEBS Lett.* *583*, 2321–2325.
- Foran, P., Shone, C.C., and Dolly, J.O. (1994). Differences in the protease activities of tetanus and botulinum B toxins revealed by the cleavage of vesicle-associated membrane protein and various sized fragments. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 15365–15374.
- Forloni, G., Terreni, L., Bertani, I., Fogliarino, S., Invernizzi, R., Assini, A., Ribizzi, G., Negro, A., Calabrese, E., Volonté, M.A., et al. (2002). Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol. Aging* *23*, 957–976.
- Foster, K.A., Adams, E.J., Durose, L., Cruttwell, C.J., Marks, E., Shone, C.C., Chaddock, J.A., Cox, C.L., Heaton, C., Sutton, J.M., et al. (2006). Re-engineering the target specificity of Clostridial neurotoxins - a route to novel therapeutics. *Neurotox. Res.* *9*, 101–107.

- Frisk, M.L., Lin, G., Johnson, E.A., and Beebe, D.J. (2011). Synaptotagmin II peptide-bead conjugate for botulinum toxin enrichment and detection in microchannels. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1929–1935.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Amphornrat, J., Thilemann, S., and others (2013). Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte–.
- Fu, Z., Chen, C., Barbieri, J.T., Kim, J.-J.P., and Baldwin, M.R. (2009). Glycosylated SV2 and Gangliosides as Dual Receptors for Botulinum Neurotoxin Serotype F. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 5631–5641.
- Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (2000). Calcium-dependent and-independent hetero-oligomerization in the synaptotagmin family. *J. Biochem. (Tokyo)* 128, 637–645.
- Géminard, C., de Gassart, A., Blanc, L., and Vidal, M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic* 5, 181–193.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., and Südhof, T.C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717–727.
- Gerona, R.R., Larsen, E.C., Kowalchuk, J.A., and Martin, T.F. (2000). The C terminus of SNAP25 is essential for Ca²⁺-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 6328–6336.
- Gil, C., Soler-Jover, A., Blasi, J., and Aguilera, J. (2005). Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 117–124.
- Gill, D.M. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* 46, 86.
- Gill, D.J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* 26, 600–612.
- Giménez, D.F., and Ciccarelli, A.S. (1970). Another type of Clostridium botulinum. *Zentralblatt Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionshygiene. 1. Abteilung Medizinische Hygiene. Bakteriologie. Virusforschung. Parasitologie. Originale.* 215, 221–224.
- Gonzalez-Escalona, N., Thirunavukkarasu, N., Singh, A., Toro, M., Brown, E.W., Zink, D., Rummel, A., and Sharma, S.K. (2014). Draft Genome Sequence of Bivalent Clostridium botulinum Strain IBCA10-7060, Encoding Botulinum Neurotoxin B and a New FA Mosaic Type. *Genome Announc.* 2, e01275-14-e01275-14.
- Gould, S.J., and Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 2.
- Gronborg, M., Pavlos, N.J., Brunk, I., Chua, J.J.E., Munster-Wandowski, A., Riedel, D., Ahnert-Hilger, G., Urlaub, H., and Jahn, R. (2010). Quantitative Comparison of Glutamatergic and GABAergic Synaptic Vesicles Unveils Selectivity for Few Proteins Including MAL2, a Novel Synaptic Vesicle Protein. *J. Neurosci.* 30, 2–12.
- Grootjans, J.J. (2000). Syntenin-Syndecan Binding Requires Syndecan-Syntenin and the Co-operation of Both PDZ Domains of Syntenin. *J. Biol. Chem.* 275, 19933–19941.

- Habermann, E., and Heller, I. (1975). Direct evidence for the specific fixation of *Cl. botulinum* A neurotoxin to brain matter. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 287, 97–106.
- Hamakubo, T., Kusano-Arai, O., and Iwanari, H. (2014). Generation of antibodies against membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 1920–1924.
- Han, W., Rhee, J.-S., Maximov, A., Lao, Y., Mashimo, T., Rosenmund, C., and Südhof, T.C. (2004). N-glycosylation is essential for vesicular targeting of synaptotagmin 1. *Neuron* 41, 85–99.
- Hanson, P.I., and Cashikar, A. (2012). Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 337–362.
- Hanson, M.A., Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.-P., Chien, E.Y.T., Velasquez, J., Kuhn, P., and Stevens, R.C. (2008). A Specific Cholesterol Binding Site Is Established by the 2.8 Å Structure of the Human β 2-Adrenergic Receptor. *Structure* 16, 897–905.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339.
- Harper, C.B., Martin, S., Nguyen, T.H., Daniels, S.J., Lavidis, N.A., Popoff, M.R., Hadzic, G., Mariana, A., Chau, N., McCluskey, A., et al. (2011). Dynamin Inhibition Blocks Botulinum Neurotoxin Type A Endocytosis in Neurons and Delays Botulism. *J. Biol. Chem.* 286, 35966–35976.
- Harris, K.P., and Littleton, J.T. (2015). Transmission, Development, and Plasticity of Synapses. *Genetics* 201, 345–375.
- Hartman, Z.C., Wei, J., Glass, O.K., Guo, H., Lei, G., Yang, X.-Y., Osada, T., Hobeika, A., Delcayre, A., Le Pecq, J.-B., et al. (2011). Increasing vaccine potency through exosome antigen targeting. *Vaccine* 29, 9361–9367.
- Haucke, V., Wenk, M.R., Chapman, E.R., Farsad, K., and De Camilli, P. (2000). Dual interaction of synaptotagmin with mu2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation. *EMBO J.* 19, 6011–6019.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C., and Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 13, 5051.
- Hazen, E.L. (1937). A strain of *B. botulinus* not classified as type A, B, or C. *J. Infect. Dis.* 260–264.
- He, Y., Wang, K., and Yan, N. (2014). The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein Cell* 5, 658–672.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood* 94, 3791–3799.
- Herreros, J., and Schiavo, G. (2002). Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 291, 447–453.
- Hilfiker, S., Pieribone, V.A., Nordstedt, C., Greengard, P., and Czernik, A.J. (1999). Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases. *J. Neurochem.* 73, 921–932.

- Hill, K.K., and Smith, T.J. (2013). Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *364*, 1–20.
- Hirano, S., Kawasaki, M., Ura, H., Kato, R., Raiborg, C., Stenmark, H., and Wakatsuki, S. (2006). Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 272–277.
- Hoch, D.H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B.E., Finkelstein, A., DasGupta, B.R., and Simpson, L.L. (1985). Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *82*, 1692–1696.
- Hollister, J., Grabenhorst, E., Nimtz, M., Conradt, H., and Jarvis, D.L. (2002). Engineering the protein N-glycosylation pathway in insect cells for production of biantennary, complex N-glycans. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 15093–15104.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J., and Poulain, B. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* *82*, 427–446.
- Hurley, J.H. (2015). ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* *34*, 2398–2407.
- Hurley, J.H., and Odorizzi, G. (2012). Get on the exosome bus with ALIX. *Nat. Cell Biol.* *14*, 654–655.
- Iezzi, M. (2005). SV2A and SV2C are not vesicular Ca²⁺ transporters but control glucose-evoked granule recruitment. *J. Cell Sci.* *118*, 5647–5660.
- Jahn, R., and Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* *490*, 201–207.
- Janz, R., and Südhof, T.C. (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* *94*, 1279–1290.
- Janz, R., Goda, Y., Geppert, M., Missler, M., and Südhof, T.C. (1999). SV2A and SV2B function as redundant Ca²⁺ regulators in neurotransmitter release. *Neuron* *24*, 1003–1016.
- Jidenko, M., Nielsen, R.C., Sørensen, T.L.-M., Møller, J.V., le Maire, M., Nissen, P., and Jaxel, C. (2005). Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11687–11691.
- Jin, R., Rummel, A., Binz, T., and Brunger, A.T. (2006). Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* *444*, 1092–1095.
- Jorquera, R.A., Huntwork-Rodriguez, S., Akbergenova, Y., Cho, R.W., and Littleton, J.T. (2012). Complexin controls spontaneous and evoked neurotransmitter release by regulating the timing and properties of synaptotagmin activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 18234–18245.
- Kaesler, P.S., and Regehr, W.G. (2014). Molecular Mechanisms for Synchronous, Asynchronous, and Spontaneous Neurotransmitter Release. *Annu. Rev. Physiol.* *76*, 333–363.
- Kalani, A., Tyagi, A., and Tyagi, N. (2014). Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. *Mol. Neurobiol.* *49*, 590–600.

- Kalb, S.R., Baudys, J., Webb, R.P., Wright, P., Smith, T.J., Smith, L.A., Fernández, R., Raphael, B.H., Maslanka, S.E., Pirkle, J.L., et al. (2012). Discovery of a novel enzymatic cleavage site for botulinum neurotoxin F5. *FEBS Lett.* *586*, 109–115.
- Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borràs, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., et al. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* *10*, e1001450.
- Kammerer, R.A., and Benoit, R.M. (2014). Botulinum neurotoxins: new questions arising from structural biology. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 517–526.
- Kanno, E., and Fukuda, M. (2008). Increased plasma membrane localization of O-glycosylation-deficient mutant of synaptotagmin I in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* *86*, 1036–1043.
- Katz, B., and Miledi, R. (1967). The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J. Physiol.* *189*, 535.
- Kavalali, E.T. (2014). The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 5–16.
- Kedar, G.H., Munch, A.S., van Weering, J.R., Malsam, J., Scheutzow, A., de Wit, H., Houy, S., Tawfik, B., Söllner, T.H., Sørensen, J.B., et al. (2015). A post-docking role of synaptotagmin 1-C2B domain bottom residues R398/399 in mouse chromaffin cells. *J. Neurosci.* *35*, 14172–14182.
- Keller, J.E., Cai, F., and Neale, E.A. (2004). Uptake of Botulinum Neurotoxin into Cultured Neurons. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 526–532.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239.
- Kim, D.-W., Lee, S.-K., and Ahnn, J. (2015). Botulinum Toxin as a Pain Killer: Players and Actions in Antinociception. *Toxins* *7*, 2435–2453.
- Kitamura, M., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1980). Interaction between Clostridium botulinum neurotoxin and gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* *628*, 328–335.
- Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., Furukawa, K., and Furukawa, K. (1999). Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim. Biophys. Acta* *1441*, 1–3.
- Kohda, T., Ihara, H., Seto, Y., Tsutsuki, H., Mukamoto, M., and Kozaki, S. (2007). Differential contribution of the residues in C-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin type B to its binding to the ganglioside GT1b and the synaptotagmin 2/GT1b complex. *Microb. Pathog.* *42*, 72–79.
- Koriazova, L.K., and Montal, M. (2003). Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 13–18.
- Kozaki, S., Miyazaki, S., and Sakaguchi, G. (1977). Development of antitoxin with each of two complementary fragments of Clostridium botulinum type B derivative toxin. *Infect. Immun.* *18*, 761–766.

- Kozaki, S., Sakaguchi, G., Nishimura, M., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1984). Inhibitory effect of ganglioside GT1b on the activities of Clostridium botulinum toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* *21*, 219–223.
- Kozaki, S., Nakaue, S., and Kamata, Y. (1995). Immunological characterization of the neurotoxin produced by Clostridium botulinum type A associated with infant botulism in Japan. *Microbiol. Immunol.* *39*, 767–774.
- Kozaki, S., Kamata, Y., Nishiki, T., Kakinuma, H., Maruyama, H., Takahashi, H., Karasawa, T., Yamakawa, K., and Nakamura, S. (1998a). Characterization of Clostridium botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. *Infect. Immun.* *66*, 4811–4816.
- Kozaki, S., Kamata, Y., Watarai, S., Nishiki, T., and Mochida, S. (1998b). Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins. *Microb. Pathog.* *25*, 91–99.
- Krämer-Albers, E.-M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K.-A., Schild, H., and Trotter, J. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *PROTEOMICS – Clin. Appl.* *1*, 1446–1461.
- Kroken, A.R., Karalewitz, A.P.-A., Fu, Z., Baldwin, M.R., Kim, J.-J.P., and Barbieri, J.T. (2011). Unique ganglioside binding by botulinum neurotoxins C and D-SA. *FEBS J.* *278*, 4486–4496.
- Kull, S., Schulz, K.M., née Strotmeier, J.W., Kirchner, S., Schreiber, T., Bollenbach, A., Dabrowski, P.W., Nitsche, A., Kalb, S.R., Dorner, M.B., et al. (2015). Isolation and functional characterization of the novel Clostridium botulinum neurotoxin A8 subtype. *PLoS One* *10*, e0116381.
- Kumar, R., Dhaliwal, H., Kukreja, R., and Singh, B. (2016). The Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent: Molecular Structure and Mechanism of Action in Motor and Sensory Systems. *Semin. Neurol.* *36*, 010–019.
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., and Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* *46*, 409–418.
- Lalli, G., Herreros, J., Osborne, S.L., Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. (1999). Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 16)*, 2715–2724.
- Lamanna, C., McElroy, O.E., Eklund, H.W., and others (1946). The purification and crystallization of Clostridium botulinum type A toxin. *Science* *103*, 613–614.
- Landmann, G. (1904). Über die Ursache der Darmstä“dter Bohnenvergiftung. *Hyg Rundsch.* 449–452.
- Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Sébastien, R.O.Y., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., et al. (2004). Mast cell-and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* *380*, 161–171.
- Lazzell, D.R., Belizaire, R., Thakur, P., Sherry, D.M., and Janz, R. (2004). SV2B Regulates Synaptotagmin 1 by Direct Interaction. *J. Biol. Chem.* *279*, 52124–52131.
- Leblanc, P., Arellano-Anaya, Z.E., Bernard, E., Gallay, L., Provansal, M., Lehmann, S., Schaeffer, L., Raposo, G., and Vilette, D. (2017). Isolation of Exosomes and Microvesicles from Cell Culture Systems to Study Prion Transmission. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1545*, 153–176.

- Lee, A.G. (2005). How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach. *Mol. Biosyst.* *1*, 203.
- Lee, A.G. (2011). Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 493–500.
- Lee, K., Gu, S., Jin, L., Le, T.T.N., Cheng, L.W., Strotmeier, J., Krueel, A.M., Yao, G., Perry, K., Rummel, A., et al. (2013). Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS Pathog* *9*, e1003690.
- Lee, K., Zhong, X., Gu, S., Krueel, A.M., Dorner, M.B., Perry, K., Rummel, A., Dong, M., and Jin, R. (2014). Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. *Science* *344*, 1405–1410.
- Leitzell, K. (2007). Synaptotagmin: Is 2 Better than 1? *J. Neurosci.* *27*, 4231–4232.
- Leuchs, J. (1910). Beiträge zur Kenntnis des Toxins und Antitoxins des Bacillus botulinus. *Z. Für Hyg. Infekt.* *65*, 55–84.
- Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., el Far, O., Sato, K., and Martin-Moutot, N. (1992). The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 3625–3629.
- Leveque, C., Boudier, J.-A., Takahashi, M., and Seagar, M. (2000). Calcium-Dependent Dissociation of Synaptotagmin from Synaptic SNARE Complexes. *J. Neurochem.* *74*, 367–374.
- Lévêque, C., Ferracci, G., Maulet, Y., Grand-Masson, C., Seagar, M., and El Far, O. (2015). A chip-based assay for botulinum neurotoxin A activity in pharmaceutical preparations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*, 4355–4360.
- Lew, M.F., Brashear, A., and Factor, S. (2000). The safety and efficacy of botulinum toxin type B in the treatment of patients with cervical dystonia: summary of three controlled clinical trials. *Neurology* *55*, S29-35.
- Li, J., Diaz-Arévalo, D., Chen, Y., and Zeng, M. (2015). Intranasal Vaccination with an Engineered Influenza Virus Expressing the Receptor Binding Subdomain of Botulinum Neurotoxin Provides Protective Immunity Against Botulism and Influenza. *Front. Immunol.* *6*.
- Licata, J.M., Simpson-Holley, M., Wright, N.T., Han, Z., Paragas, J., and Harty, R.N. (2003). Overlapping Motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola Virus VP40 Protein Function Independently as Late Budding Domains: Involvement of Host Proteins TSG101 and VPS-4. *J. Virol.* *77*, 1812–1819.
- Liu, S. (2005). HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers. *AJP Cell Physiol.* *290*, C990–C999.
- Liu, Y., Li, R., and Ladisch, S. (2004). Exogenous Ganglioside GD1a Enhances Epidermal Growth Factor Receptor Binding and Dimerization. *J. Biol. Chem.* *279*, 36481–36489.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* *309*, 897–903.

- Löscher, W., Gillard, M., Sands, Z.A., Kaminski, R.M., and Klitgaard, H. (2016). Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond. *CNS Drugs* 30, 1055–1077.
- Lv, J.-H., He, L., and Sui, S.-F. (2008). Lipid rafts association of synaptotagmin I on synaptic vesicles. *Biochem. Biokhimiia* 73, 283–288.
- Lyons, J.A., Shahsavari, A., Paulsen, P.A., Pedersen, B.P., and Nissen, P. (2016). Expression strategies for structural studies of eukaryotic membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 38, 137–144.
- Maccioni, H.J. (2007). Glycosylation of glycolipids in the Golgi complex. *J. Neurochem.* 103, 81–90.
- Maeda, S., and Schertler, G.F. (2013). Production of GPCR and GPCR complexes for structure determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 381–392.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* 580, 2011–2014.
- Mahrhold, S., Strotmeier, J., Garcia-Rodriguez, C., Lou, J., Marks, J.D., Rummel, A., and Binz, T. (2013). Identification of the SV2 protein receptor-binding site of botulinum neurotoxin type E. *Biochem. J.* 453, 37–47.
- Mahrhold, S., Bergstrom, T., Stern, D., Dorner, B.G., Astot, C., and Rummel, A. (2016). Only the complex N559-glycan in the synaptic vesicle glycoprotein 2C mediates high affinity binding to botulinum neurotoxin serotype A1. *Biochem. J.* 473, 2645–2654.
- Maksymowych, A.B., Reinhard, M., Malizio, C.J., Goodnough, M.C., Johnson, E.A., and Simpson, L.L. (1999). Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infect. Immun.* 67, 4708–4712.
- Marconi, S., Ferracci, G., Berthomieu, M., Kozaki, S., Miquelis, R., Boucraut, J., Seagar, M., and Lévêque, C. (2008). A protein chip membrane-capture assay for botulinum neurotoxin activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 439–446.
- Marius, P., Zagnoni, M., Sandison, M.E., East, J.M., Morgan, H., and Lee, A.G. (2008). Binding of Anionic Lipids to at Least Three Nonannular Sites on the Potassium Channel KcsA is Required for Channel Opening. *Biophys. J.* 94, 1689–1698.
- Marsh, M., and Thali, M. (2003). HIV's great escape. *Nat. Med.* 9, 1262–1263.
- Martin, T.F.J. (2015). PI(4,5)P₂-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 785–793.
- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7, 1313–1319.
- Marxen, P., Fuhrmann, U., and Bigalke, H. (1989). Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology* 27, 849–859.
- Marzesco, A.-M. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118, 2849–2858.

- Masuyer, G., Chaddock, J.A., Foster, K.A., and Acharya, K.R. (2014). Engineered Botulinum Neurotoxins as New Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *54*, 27–51.
- Masyuk, A.I., Huang, B.Q., Ward, C.J., Gradilone, S.A., Banales, J.M., Masyuk, T.V., Radtke, B., Splinter, P.L., and LaRusso, N.F. (2010). Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *299*, G990–G999.
- Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E., and Simpson, R.J. (2012). ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* *40*, D1241–D1244.
- Matsui, T., Gu, S., Lam, K., Carter, L.G., Rummel, A., Mathews, I.I., and Jin, R. (2014). Structural Basis of the pH-Dependent Assembly of a Botulinum Neurotoxin Complex. *J. Mol. Biol.* *426*, 3773–3782.
- Matthew, W.D., Tsavaler, L., and Reichardt, L.F. (1981). Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J. Cell Biol.* *91*, 257–269.
- McCroskey, L.M., Hatheway, C.L., Fencia, L., Pasolini, B., and Aureli, P. (1986). Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J. Clin. Microbiol.* *23*, 201–202.
- McCroskey, L.M., Hatheway, C.L., Woodruff, B.A., Greenberg, J.A., and Jurgenson, P. (1991). Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. *J. Clin. Microbiol.* *29*, 2618–2620.
- Mendoza-Torreblanca, J.G., Vanoye-Carlo, A., Phillips-Farfán, B.V., Carmona-Aparicio, L., and Gómez-Lira, G. (2013). Synaptic vesicle protein 2A: basic facts and role in synaptic function. *Eur. J. Neurosci.* *38*, 3529–3539.
- Ménétreay, J., Gillet, D., and Ménez, A. (2005). Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *45*, 129–137.
- Meyer, K.F., and Gunnison, J.B. (1929). South African Cultures of *Clostridium botulinum* and paratubulinum. XXXVII: With a Description of *Cl. botulinum* Type D, n. sp. *J. Infect. Dis.* *45*, 106–118.
- Michael, A., Bajracharya, S., Yuen, P., Zhou, H., Star, R., Illei, G., and Alevizos, I. (2010). Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers: microRNA biomarkers in salivary exosomes. *Oral Dis.* *16*, 34–38.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* *260*, 289–298.
- Möbius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E.G., Oorschot, V.M., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F., Geuze, H.J., and Slot, J.W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J. Histochem. Cytochem.* *50*, 43–55.
- Moller, V., and Scheibel, I. (1960). Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Cl. botulinum*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* *48*, 80.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* *119*, 756–766.

- Montecucco, C. (1986). How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.* *11*, 314–317.
- Moriishi, K., Syuto, B., Kubo, S., and Oguma, K. (1989). Molecular diversity of neurotoxins from *Clostridium botulinum* type D strains. *Infect. Immun.* *57*, 2886–2891.
- Moriishi, K., Koura, M., Abe, N., Fujii, N., Fujinaga, Y., Inoue, K., and Ogumad, K. (1996a). Mosaic structures of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* types C and D organisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1307*, 123–126.
- Moriishi, K., Koura, M., Fujii, N., Fujinaga, Y., Inoue, K., Syuto, B., and Oguma, K. (1996b). Molecular cloning of the gene encoding the mosaic neurotoxin, composed of parts of botulinum neurotoxin types C1 and D, and PCR detection of this gene from *Clostridium botulinum* type C organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 662–667.
- Muraro, L., Tosatto, S., Motterlini, L., Rossetto, O., and Montecucco, C. (2009). The N-terminal half of the receptor domain of botulinum neurotoxin A binds to microdomains of the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *380*, 76–80.
- Nagy, G. (2006). Different Effects on Fast Exocytosis Induced by Synaptotagmin 1 and 2 Isoforms and Abundance But Not by Phosphorylation. *J. Neurosci.* *26*, 632–643.
- Nicholson-Tomishima, K., and Ryan, T.A. (2004). Kinetic efficiency of endocytosis at mammalian CNS synapses requires synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16648–16652.
- van Niel, G. (2006). Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *J. Biochem. (Tokyo)* *140*, 13–21.
- van Niel, G. (2016). Study of Exosomes Shed New Light on Physiology of Amyloidogenesis. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 327–342.
- Nishiki, T., Ogasawara, J., Kamata, Y., and Kozaki, S. (1993). Solubilization and characterization of the acceptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin from rat brain synaptic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1158*, 333–338.
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1994). Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* *269*, 10498–10503.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1996a). The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett.* *378*, 253–257.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sekiguchi, M., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1996b). Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci. Lett.* *208*, 105–108.
- Nolte-’t Hoen, E.N.M., van der Vlist, E.J., de Boer-Brouwer, M., Arkesteijn, G.J.A., Stoorvogel, W., and Wauben, M.H.M. (2013). Dynamics of dendritic cell-derived vesicles: high-resolution flow cytometric analysis of extracellular vesicle quantity and quality. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 395–402.
- Ochanda, J.O., Syuto, B., Ohishi, I., Naiki, M., and Shuichiro, K. (1986). Binding of *Clostridium botulinum* neurotoxin to gangliosides. *J. Biochem. (Tokyo)* *100*, 27–33.

- Ogasawara, J., Kamata, Y., Sakaguchi, G., and Kozaki, S. (1991). Properties of a protease-sensitive acceptor component in mouse brain synaptosomes for Clostridium botulinum type B neurotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* *63*, 351–355.
- Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamaguchi, T., Toda, T., Endo, T., Tsubuki, M., et al. (2011). Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol. Pharm. Bull.* *34*, 13–23.
- Ohishi, I., Sugii, S., and Sakaguchi, G. (1977). Oral toxicities of Clostridium botulinum toxins in response to molecular size. *Infect. Immun.* *16*, 107–109.
- Ohno, S.-I., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., et al. (2013). Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *21*, 185–191.
- Osborne, S.L., Herreros, J., Bastiaens, P.I., and Schiavo, G. (1999). Calcium-dependent oligomerization of synaptotagmins I and II. Synaptotagmins I and II are localized on the same synaptic vesicle and heterodimerize in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.* *274*, 59–66.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* *12*, 19–30.
- Palmano, K., Rowan, A., Guillermo, R., Guan, J., and Jarrow, P. (2015). The Role of Gangliosides in Neurodevelopment. *Nutrients* *7*, 3891–3913.
- Pan, B.-T., and Johnstone, R.M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* *33*, 967–978.
- Pan, A.C., Borhani, D.W., Dror, R.O., and Shaw, D.E. (2013). Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics. *Drug Discov. Today* *18*, 667–673.
- Pang, Z.P., Melicoff, E., Padgett, D., Liu, Y., Teich, A.F., Dickey, B.F., Lin, W., Adachi, R., and Südhof, T.C. (2006a). Synaptotagmin-2 Is Essential for Survival and Contributes to Ca²⁺ Triggering of Neurotransmitter Release in Central and Neuromuscular Synapses. *J. Neurosci.* *26*, 13493–13504.
- Pang, Z.P., Sun, J., Rizo, J., Maximov, A., and Südhof, T.C. (2006b). Genetic analysis of synaptotagmin 2 in spontaneous and Ca²⁺-triggered neurotransmitter release. *EMBO J.* *25*, 2039–2050.
- Pantano, S., and Montecucco, C. (2014). The blockade of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 793–811.
- Passaro, D.J., Werner, S.B., McGee, J., Mac Kenzie, W.R., and Vugia, D.J. (1998). Wound botulism associated with black tar heroin among injecting drug users. *JAMA* *279*, 859–863.
- Patton, G.S., Morris, S.A., Chung, W., Bieniasz, P.D., and McClure, M.O. (2005). Identification of Domains in Gag Important for Prototypic Foamy Virus Egress. *J. Virol.* *79*, 6392–6399.
- Peck, M., Smith, T., Anniballi, F., Austin, J., Bano, L., Bradshaw, M., Cuervo, P., Cheng, L., Derman, Y., Dorner, B., et al. (2017). Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins* *9*, 38.

- Pellett, S., Tepp, W.H., Scherf, J.M., and Johnson, E.A. (2015). Botulinum Neurotoxins Can Enter Cultured Neurons Independent of Synaptic Vesicle Recycling. *PLoS One* *10*, e0133737.
- Peng, L., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Dong, M. (2011). Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog* *7*, e1002008.
- Peng, L., Berntsson, R.P.-A., Tepp, W.H., Pitkin, R.M., Johnson, E.A., Stenmark, P., and Dong, M. (2012). Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I and II as receptors, and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C and G toxins. *J. Cell Sci.* *125*, 3233–3242.
- Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R., and Südhof, T.C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* *345*, 260–263.
- Pinheiro, P.S., Houy, S., and Sørensen, J.B. (2016). C2-domain containing calcium sensors in neuroendocrine secretion. *J. Neurochem.* *139*, 943–958.
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Bolognese, P., Shone, C.C., and Montecucco, C. (2011). Double anchorage to the membrane and intact inter-chain disulfide bond are required for the low pH induced entry of tetanus and botulinum neurotoxins into neurons. *Cell. Microbiol.* *13*, 1731–1743.
- Pirazzini, M., Bordin, F., Rossetto, O., Shone, C.C., Binz, T., and Montecucco, C. (2013). The thioredoxin reductase-thioredoxin system is involved in the entry of tetanus and botulinum neurotoxins in the cytosol of nerve terminals. *FEBS Lett.* *587*, 150–155.
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., and Montecucco, C. (2017). Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol. Rev.* *69*, 200–235.
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., and Knepper, M.A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13368–13373.
- Pitt, J.M., André, F., Amigorena, S., Soria, J.-C., Eggermont, A., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2016). Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* *126*, 1224–1232.
- van der Pol, E., Böing, A.N., Gool, E.L., and Nieuwland, R. (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost. JTH* *14*, 48–56.
- Popot, J.-L. (2014). Folding membrane proteins in vitro: A table and some comments. *Arch. Biochem. Biophys.* *564*, 314–326.
- Popot, J.-L., and Engelman, D.M. (2016). Membranes Do Not Tell Proteins How To Fold. *Biochemistry (Mosc.)* *55*, 5–18.
- von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J., and Südhof, T.C. (1997). The evolutionary pressure to inactivate a subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca²⁺ binding. *J. Biol. Chem.* *272*, 14314–14319.
- Poulain, B., Popoff, M.R., and Molgo, J. (2008). How do the Botulinum Neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *Botulinum J* *1*, 14.

- Powl, A.M., East, J.M., and Lee, A.G. (2008). Anionic Phospholipids Affect the Rate and Extent of Flux through the Mechanosensitive Channel of Large Conductance MscL[†]. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 4317–4328.
- Prasanna, X., Jafurulla, M., Sengupta, D., and Chattopadhyay, A. (2016). The ganglioside GM1 interacts with the serotonin1A receptor via the sphingolipid binding domain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1858*, 2818–2826.
- Prescott, G.R., Gorleku, O.A., Greaves, J., and Chamberlain, L.H. (2009). Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery: Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery. *J. Neurochem.* *110*, 1135–1149.
- Proux-Gillardeaux, V., Raposo, G., Irinopoulou, T., and Galli, T. (2007). Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration. *Biol. Cell* *99*, 261–271.
- Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D., and Kloecker, G.H. (2009). Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* *10*, 42–46.
- Raciborska, D.A., Trimble, W.S., and Charlton, M.P. (1998). Presynaptic protein interactions in vivo: evidence from botulinum A, C, D and E action at frog neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2617–2628.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.J., D'Arrigo, A., Stang, E., and Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell Sci.* *114*, 2255–2263.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., and Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 1574–1584.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* *200*, 373–383.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* *183*, 1161–1172.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., and Desaynard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol. Biol. Cell* *8*, 2631–2645.
- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., and Marks, M.S. (2001). Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells ☪. *J. Cell Biol.* *152*, 809–824.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., and Ratajczak, M.Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* *20*, 847–856.
- Rohrbough, J., and Broadie, K. (2005). Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 139–150.
- Ronquist, G., and Brody, I. (1985). The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim. Biophys. Acta* *822*, 203–218.

- Ronquist, G., and Nilsson, B.O. (2004). The Janus-faced nature of prostasomes: their pluripotency favours the normal reproductive process and malignant prostate growth. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7, 21–31.
- Rosa, P., and Fratangeli, A. (2010). Cholesterol and synaptic vesicle exocytosis. *Commun. Integr. Biol.* 3, 352–353.
- Rosen, O., Ozeri, E., Barnea, A., David, A., and Zichel, R. (2016). Development of an Innovative in Vitro Potency Assay for Anti-Botulinum Antitoxins. *Toxins* 8, 276.
- Rosow, L.K., and Strober, J.B. (2015). Infant Botulism: Review and Clinical Update. *Pediatr. Neurol.* 52, 487–492.
- Rossetto, O., Schiavo, G., Montecucco, C., Poulain, B., Deloye, F., Lozzi, L., and Shone, C.C. (1994). SNARE motif and neurotoxins. *Nature* 372, 415–416.
- Rossetto, O., Megighian, A., Scorzeto, M., and Montecucco, C. (2013). Botulinum neurotoxins. *Toxicon* 67, 31–36.
- Rossetto, O., Pirazzini, M., and Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 535–549.
- Rummel, A. (2012). Double Receptor Anchorage of Botulinum Neurotoxins Accounts for their Exquisite Neurospecificity. In *Botulinum Neurotoxins*, A. Rummel, and T. Binz, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 61–90.
- Rummel, A. (2015). The long journey of botulinum neurotoxins into the synapse. *Toxicon* 107, 9–24.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. (2003). The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction: Ganglioside binding of botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* 51, 631–643.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004). Synaptotagmins I and II Act as Nerve Cell Receptors for Botulinum Neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* 279, 30865–30870.
- Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., Sandhoff, K., Proia, R.L., Acharya, K.R., Bigalke, H., et al. (2007). Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 359–364.
- Rummel, A., Häfner, K., Mahrhold, S., Darashchonak, N., Holt, M., Jahn, R., Beermann, S., Karnath, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2009). Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J. Neurochem.* 110, 1942–1954.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. (2011). Exchange of the HCC domain mediating double receptor recognition improves the pharmacodynamic properties of botulinum neurotoxin: Improving the potency of botulinum neurotoxin. *FEBS J.* 278, 4506–4515.
- Rusnak, J.M., and Smith, L.A. (2009). Botulinum Neurotoxin Vaccines: Past history and recent developments. *Hum. Vaccin.* 5, 794–805.

- Sahdev, S., Khattar, S.K., and Saini, K.S. (2007). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* *307*, 249–264.
- Saheki, Y., and De Camilli, P. (2012). Synaptic Vesicle Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a005645–a005645.
- Sakaguchi, G. (1982). Clostridium botulinum toxins. *Pharmacol. Ther.* *19*, 165–194.
- Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell Sci.* *115*, 2505–2515.
- Schenck, S., Wojcik, S.M., Brose, N., and Takamori, S. (2009). A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.* *12*, 156–162.
- Schengrund, C.-L. (2015). Gangliosides: glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 397–406.
- Schiavo, G. (2004). Dangerous liaisons on neurons. *J Biol Chem* *279*, 30865–30870.
- Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J.E., and Söllner, T.H. (1997). Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 997–1001.
- Schivell, A.E., Mochida, S., Kensel-Hammes, P., Custer, K.L., and Bajjalieh, S.M. (2005). SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol. Cell. Neurosci.* *29*, 56–64.
- Schnaar, R.L. (2016). Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J. Mol. Biol.* *428*, 3325–3336.
- Schnaar, R.L., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2014). Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* *94*, 461–518.
- Schuh, A.L., and Audhya, A. (2014). The ESCRT machinery: From the plasma membrane to endosomes and back again. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *49*, 242–261.
- Schwarz, T.L. (2004). Synaptotagmin promotes both vesicle fusion and recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16401–16402.
- Scott, A.B. (1981). Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* *79*, 734.
- Sheikh, K.A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T.O., Proia, R.L., Griffin, J.W., and Schnaar, R.L. (1999). Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 7532–7537.
- Sheridan, R.E. (1998). Gating and permeability of ion channels produced by botulinum toxin types A and E in PC12 cell membranes. *Toxicon* *36*, 703–717.
- Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* *459*, 446–450.

- Shone, C.C., HAMBLETON, P., and MELLING, J. (1985). Inactivation of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. *Eur. J. Biochem.* *151*, 75–82.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 31–39.
- Simpson, L. (1989). *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin* (Academic Press, Inc).
- Simpson, L. (2013). The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon* *68*, 40–59.
- Simpson, L.L., and Rapport, M.M. (1971). Ganglioside inactivation of botulinum toxin. *J. Neurochem.* *18*, 1341–1343.
- Skarin, H., Håfström, T., Westerberg, J., and Segerman, B. (2011). *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC Genomics* *12*, 1.
- Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* *66*, 30–41.
- Slater, C.R. (2015). The functional organization of motor nerve terminals. *Prog. Neurobiol.* *134*, 55–103.
- Smith, L.D. (1977). *Botulism: the organism, its toxins, the disease* (Springfield, Ill: Thomas).
- Smith, T.J., Lou, J., Geren, I.N., Forsyth, C.M., Tsai, R., LaPorte, S.L., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Johnson, E.A., Smith, L.A., et al. (2005). Sequence Variation within Botulinum Neurotoxin Serotypes Impacts Antibody Binding and Neutralization. *Infect. Immun.* *73*, 5450–5457.
- Smith, T.J., Hill, K.K., Xie, G., Foley, B.T., Williamson, C.H., Foster, J.T., Johnson, S.L., Chertkov, O., Teshima, H., Gibbons, H.S., et al. (2015). Genomic sequences of six botulinum neurotoxin-producing strains representing three clostridial species illustrate the mobility and diversity of botulinum neurotoxin genes. *Infect. Genet. Evol.* *30*, 102–113.
- Snipe, P.T., and Sommer, H. (1928). Studies on botulinus toxin 3. Acid precipitation of botulinus toxin. *J. Infect. Dis.* *43*, 152–160.
- Sobel, J. (2005). Botulism. *Clin. Infect. Dis.* *41*, 1167–1173.
- Sokolova, V., Ludwig, A.-K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P.A., Epple, M., and Giebel, B. (2011). Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *87*, 146–150.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* *362*, 318–324.
- Somm, E., Bonnet, N., Martinez, A., Marks, P.M.H., Cadd, V.A., Elliott, M., Toulotte, A., Ferrari, S.L., Rizzoli, R., Hüppi, P.S., et al. (2012). A botulinum toxin-derived targeted secretion inhibitor downregulates the GH/IGF1 axis. *J. Clin. Invest.* *122*, 3295–3306.
- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., and Prinetti, A. (2006). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* *17*, 1R–13R.

- Sonnino, S., Aureli, M., Loberto, N., Chigorno, V., and Prinetti, A. (2010). Fine tuning of cell functions through remodeling of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycohydrolases. *FEBS Lett.* *584*, 1914–1922.
- Souillard, R., Maréchal, C.L., Hollebecque, F., Rouxel, S., Barbé, A., Houard, E., Léon, D., Poëzévara, T., Fach, P., Woudstra, C., et al. (2015). Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet. Microbiol.* *180*, 142–145.
- Soung, Y.H., Nguyen, T., Cao, H., Lee, J., and Chung, J. (2016). Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep.* *49*, 18–25.
- Stahelin, R.V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K.S., Murray, D., and Cho, W. (2002). Phosphatidylinositol 3-Phosphate Induces the Membrane Penetration of the FYVE Domains of Vps27p and Hrs. *J. Biol. Chem.* *277*, 26379–26388.
- Starling, A.P., Dalton, K.A., East, J.M., Olivier, S., and Lee, A.G. (1996). Effects of phosphatidylethanolamines on the activity of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* *320*, 309–314.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 513–525.
- Stenmark, P., Dupuy, J., Imamura, A., Kiso, M., and Stevens, R.C. (2008). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog.* *4*, e1000129.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Göttlinger, H.G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* *114*, 689–699.
- Strotmeier, J., Mahrhold, S., Krez, N., Janzen, C., Lou, J., Marks, J.D., Binz, T., and Rummel, A. (2014). Identification of the synaptic vesicle glycoprotein 2 receptor binding site in botulinum neurotoxin A. *FEBS Lett.* *588*, 1087–1093.
- Stühmer, W., Ruppersberg, J.P., Schröter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, K.P., Penschke, A., Baumann, A., and Pongs, O. (1989). Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* *8*, 3235–3244.
- Südhof, T.C. (2004). THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE. *Annu. Rev. Neurosci.* *27*, 509–547.
- Südhof, T.C. (2013). Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* *80*, 675–690.
- Südhof, T.C., and Rothman, J.E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* *323*, 474–477.
- Sugawara, Y., Matsumura, T., Takegahara, Y., Jin, Y., Tsukasaki, Y., Takeichi, M., and Fujinaga, Y. (2010). Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J. Cell Biol.* *189*, 691–700.
- Sugita, S., Shin, O.-H., Han, W., Lao, Y., and Südhof, T.C. (2002). Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca²⁺ sensors with distinct Ca²⁺ affinities. *EMBO J.* *21*, 270–280.

- Sun, J., Pang, Z.P., Qin, D., Fahim, A.T., Adachi, R., and Südhof, T.C. (2007). A dual-Ca²⁺-sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* *450*, 676–682.
- Sun, S., Suresh, S., Liu, H., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Edwardson, J.M., and Chapman, E.R. (2011). Receptor Binding Enables Botulinum Neurotoxin B to Sense Low pH for Translocation Channel Assembly. *Cell Host Microbe* *10*, 237–247.
- Sundquist, W.I., Schubert, H.L., Kelly, B.N., Hill, G.C., Holton, J.M., and Hill, C.P. (2004). Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol. Cell* *13*, 783–789.
- Sutton, R.B., Davletov, B.A., Berghuis, A.M., Südhof, T.C., and Sprang, S.R. (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* *80*, 929–938.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* *395*, 347–353.
- Takahashi, M., Arimatsu, Y., Fujita, S., Fujimoto, Y., Kondo, S., Hama, T., and Miyamoto, E. (1991). Protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylate a novel 58-kDa protein in synaptic vesicles. *Brain Res.* *551*, 279–292.
- Takamizawa, K., Iwamori, M., Kozaki, S., Sakaguchi, G., Tanaka, R., Takayama, H., and Nagai, Y. (1986). TLC immunostaining characterization of Clostridium botulinum type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids. *FEBS Lett.* *201*, 229–232.
- Takamori, M., Hamada, T., Komai, K., Takahashi, M., and Yoshida, A. (1994). Synaptotagmin can cause an immune-mediated model of Lambert-Eaton myasthenic syndrome in rats. *Ann. Neurol.* *35*, 74–80.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., et al. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* *127*, 831–846.
- Tao, X., Avalos, J.L., Chen, J., and MacKinnon, R. (2009). Crystal Structure of the Eukaryotic Strong Inward-Rectifier K⁺ Channel Kir2.2 at 3.1 Å Resolution. *Science* *326*, 1668–1674.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Dev. Cell* *15*, 578–589.
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B.L., and Emr, S.D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* *29*, 871–883.
- Theos, A.C., Truschel, S.T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D.C., Berson, J.F., Thomas, P.C., Raposo, G., and Marks, M.S. (2006). A Lumenal Domain-Dependent Pathway for Sorting to Intraluminal Vesicles of Multivesicular Endosomes Involved in Organelle Morphogenesis. *Dev. Cell* *10*, 343–354.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol. Baltim. Md* *166*, 7309–7318.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 3–22.
- Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F., and Huttner, W.B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* *2*, 42–49.

- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G.J., Wei, J., and Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 35, 2383–2390.
- Torrens, J.K. (1998). Clostridium botulinum was named because of association with" sausage poisoning. *BMJ* 316, 151.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, J.N., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* 645, 63–70.
- Tsuji, K., and Perkins, W.E. (1962). Sporulation of Clostridium botulinum I. Selection of an aparticulate sporulation medium. *J. Bacteriol.* 84, 81–85.
- Vaidyanathan, V.V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dörries, C., Bade, S., Nauenburg, S., Niemann, H., and Binz, T. (1999). Proteolysis of SNAP-25 Isoforms by Botulinum Neurotoxin Types A, C, and E. *J. Neurochem.* 72, 327–337.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, 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.
- Van Ermengem, E. (1897). Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehung zum Botulismus. *Z Hyg Infekt.* 1–56.
- Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337–349.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011). The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev. Cell* 21, 708–721.
- Vazquez-Cintron, E.J., Vakulenko, M., Band, P.A., Stanker, L.H., Johnson, E.A., and Ichtchenko, K. (2014). Atoxic Derivative of Botulinum Neurotoxin A as a Prototype Molecular Vehicle for Targeted Delivery to the Neuronal Cytoplasm. *PLoS ONE* 9, e85517.
- Vella, L.J., Sharples, R.A., Lawson, V.A., Masters, C.L., Cappai, R., and Hill, A.F. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J. Pathol.* 211, 582–590.
- Vinson, M., Strijbos, P.J., Rowles, A., Facci, L., Moore, S.E., Simmons, D.L., and Walsh, F.S. (2001). Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J. Biol. Chem.* 276, 20280–20285.
- Wallin, E., and von Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 7, 1029–1038.
- Wan, Q.-F., Zhou, Z.-Y., Thakur, P., Vila, A., Sherry, D.M., Janz, R., and Heidelberger, R. (2010). SV2 Acts via Presynaptic Calcium to Regulate Neurotransmitter Release. *Neuron* 66, 884–895.

- Wang, H., Norris, K.M., and Mansky, L.M. (2002). Analysis of Bovine Leukemia Virus Gag Membrane Targeting and Late Domain Function. *J. Virol.* *76*, 8485–8493.
- Wang, J., Meng, J., Lawrence, G.W., Zurawski, T.H., Sasse, A., Bodeker, M.O., Gilmore, M.A., Fernandez-Salas, E., Francis, J., Steward, L.E., et al. (2008). Novel Chimeras of Botulinum Neurotoxins A and E Unveil Contributions from the Binding, Translocation, and Protease Domains to Their Functional Characteristics. *J. Biol. Chem.* *283*, 16993–17002.
- Wang, J., Zurawski, T.H., Meng, J., Lawrence, G., Olango, W.M., Finn, D.P., Wheeler, L., and Dolly, J.O. (2011). A Dileucine in the Protease of Botulinum Toxin A Underlies Its Long-lived Neuroparalysis: TRANSFER OF LONGEVITY TO A NOVEL POTENTIAL THERAPEUTIC. *J. Biol. Chem.* *286*, 6375–6385.
- Wang, J., Zurawski, T.H., Bodeker, M.O., Meng, J., Boddul, S., Aoki, K.R., and Dolly, J.O. (2012). Longer-acting and highly potent chimaeric inhibitors of excessive exocytosis created with domains from botulinum neurotoxin A and B. *Biochem. J.* *444*, 59–67.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* *92*, 759–772.
- Weisemann, J., Stern, D., Mahrhold, S., Dorner, B., and Rummel, A. (2016). Botulinum Neurotoxin Serotype A Recognizes Its Protein Receptor SV2 by a Different Mechanism than Botulinum Neurotoxin B Synaptotagmin. *Toxins* *8*, 154.
- Werner, S.B., Passaro, D., McGee, J., Schechter, R., and Vugia, D.J. (2000). Wound botulism in California, 1951-1998: recent epidemic in heroin injectors. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *31*, 1018–1024.
- White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E., and Futter, C.E. (2006). EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J.* *25*, 1–12.
- Wienisch, M., and Klingauf, J. (2006). Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nat. Neurosci.* *9*, 1019–1027.
- Wild, E., Bonifas, U., Klimek, J., Trösemeier, J.-H., Krämer, B., Kegel, B., and Behrendorf-Nicol, H.A. (2016). In vitro potency determination of botulinum neurotoxin B based on its receptor-binding and proteolytic characteristics. *Toxicol. In Vitro* *34*, 97–104.
- Willems, A., East, A.K., Lawson, P.A., and Collins, M.D. (1993). Sequence of the gene coding for the neurotoxin of *Clostridium botulinum* type A associated with infant botulism: comparison with other clostridial neurotoxins. *Res. Microbiol.* *144*, 547–556.
- Williamson, C.H., Sahl, J.W., Smith, T.J., Xie, G., Foley, B.T., Smith, L.A., Fernández, R.A., Lindström, M., Korkeala, H., Keim, P., et al. (2016). Comparative genomic analyses reveal broad diversity in botulinum-toxin-producing *Clostridia*. *BMC Genomics* *17*, 1.
- Willig, K.I., Rizzoli, S.O., Westphal, V., Jahn, R., and Hell, S.W. (2006). STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* *440*, 935–939.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* *7*, 297–303.

- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION. *J. Biol. Chem.* *278*, 10963–10972.
- Yamashita, T., Wu, Y.-P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (2005). Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon–glial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2725–2730.
- Yang, X.-F., Weisenfeld, A., and Rothman, S.M. (2007). Prolonged Exposure to Levetiracetam Reveals a Presynaptic Effect on Neurotransmission. *Epilepsia* *48*, 1861–1869.
- Yao, J., Nowack, A., Kensel-Hammes, P., Gardner, R.G., and Bajjalieh, S.M. (2010). Cotrafficking of SV2 and Synaptotagmin at the Synapse. *J. Neurosci.* *30*, 5569–5578.
- Yildirim, M.A., Goh, K.-I., Cusick, M.E., Barabási, A.-L., and Vidal, M. (2007). Drug—target network. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1119–1126.
- Yim, N. (2016). Extracellular vesicles as novel carriers for therapeutic molecules. *BMB Rep.* *49*, 585–586.
- Yoshihara, M., Guan, Z., and Littleton, J.T. (2010). Differential regulation of synchronous versus asynchronous neurotransmitter release by the C2 domains of synaptotagmin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 14869–14874.
- Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., et al. (2009). Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9483–9488.
- Yowler, B.C. (2002). Botulinum Neurotoxin A Activity Is Dependent upon the Presence of Specific Gangliosides in Neuroblastoma Cells Expressing Synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* *277*, 32815–32819.
- Yowler, B.C., and Schengrund, C.-L. (2004a). Glycosphingolipids—Sweets for botulinum neurotoxin. *Glycoconj. J.* *21*, 287–293.
- Yowler, B.C., and Schengrund, C.-L. (2004b). Botulinum Neurotoxin A Changes Conformation upon Binding to Ganglioside GT1b[†]. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 9725–9731.
- Yu, R.K., Nakatani, Y., and Yanagisawa, M. (2008). The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J. Lipid Res.* *50*, S440–S445.
- Yu, K Robert, K.Y., Tsai, Y.-T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011). Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—an overview. *J. Oleo Sci.* *60*, 537.
- Zanetti, M.N., Bello, O.D., Wang, J., Coleman, J., Cai, Y., Sindelar, C.V., Rothman, J.E., and Krishnakumar, S.S. (2016). Ring-like oligomers of Synaptotagmins and related C2 domain proteins. *eLife* *5*, e17262.
- Zeelenberg, I.S., Ostrowski, M., Krumeich, S., Bobrie, A., Jancic, C., Boissonnas, A., Delcayre, A., Le Pecq, J.-B., Combadiere, B., Amigorena, S., et al. (2008). Targeting Tumor Antigens to Secreted Membrane Vesicles In vivo Induces Efficient Antitumor Immune Responses. *Cancer Res.* *68*, 1228–1235.

Zhang, J.-C., Sun, L., and Nie, Q.-H. (2010). Botulism, where are we now? *Clin. Toxicol.* 48, 867–879.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 594–600.

RESUME

Les neurotoxines botuliques (BoNTs) sécrétées par des bactéries du genre *Clostridium*, sont à l'origine du botulisme humain et animal qui se traduit par une paralysie flasque due au blocage de la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire. Par ailleurs, ces neurotoxines présentent un intérêt thérapeutique majeur pour le traitement d'affections neurologiques multiples. La BoNT/B se lie et pénètre dans les neurones par l'intermédiaire de deux récepteurs membranaires: la synaptotagmine2 (SYT2) et un poly-sialoganglioside de type GT1b.

En utilisant une technologie innovante, j'ai validé l'utilité d'un système permettant de cibler vers les exosomes des protéines recombinantes complexes dont les récepteurs protéiques des BoNTs. Des exosomes exprimant un canal potassium hétérotétramérique, une protéine de type GPCR ou la SYT2 ont été ainsi produits. Des tests de liaison de ligands spécifiques et dépendants d'une conformation native de ces récepteurs ont été réalisés avec succès. La BoNT/B se lie sur des exosomes exprimant la SYT2 en présence de GT1b selon un modèle d'interaction 1 :1, avec une affinité ($K_D = 0.6$ nM) comparable à celle qui est trouvée sur des préparations de terminaisons nerveuses natives. L'expression de protéines membranaires complexes dans des exosomes représente donc une technologie prometteuse pour de nombreuses études pharmacologiques et le développement de nouveaux médicaments.

Dans un deuxième volet de ce travail, j'ai montré que la BoNT/B se lie avec une faible affinité et de façon très transitoire sur le GT1b associé à des exosomes et que cette interaction n'est pas détectée dans un contexte cellulaire. En revanche la BoNT/B lie des exosomes exprimant la SYT2 avec une affinité de 40 nM ainsi que la SYT2 transfectée dans des cellules PC12 en culture. La présence de GT1b dans les exosomes SYT2 induit un gain d'affinité d'un facteur 65, essentiellement par un accroissement de la constante cinétique d'association de la BoNT/B. J'ai pu établir que le domaine juxta-membranaire extra cellulaire de la SYT2 lie directement la tête polaire du GT1b avec une affinité de 3 μ M, interaction confirmée par modélisation moléculaire. La première lysine du domaine extra cellulaire (K60) est directement impliquée dans l'interaction avec le GT1b et sa mutation affecte la liaison de la BoNT/B sur le complexe SYT2/GT1b. A partir de ces résultats, nous proposons un nouveau modèle de reconnaissance des terminaisons synaptiques par la BoNT/B dans lequel, la toxine interagit avec un co-récepteur SYT2/GT1b préalablement assemblé. Ceci représenterait une première étape déterminante dans la séquence d'évènements conduisant à l'intoxication du neurone.