



HAL
open science

Exosomes neuronaux: sécrétion de protéines membranaires impliquées dans les processus physiologiques et pathologiques du système nerveux.

Gaëlle Moisand Lachenal

► To cite this version:

Gaëlle Moisand Lachenal. Exosomes neuronaux: sécrétion de protéines membranaires impliquées dans les processus physiologiques et pathologiques du système nerveux.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00481716

HAL Id: tel-00481716

<https://theses.hal.science/tel-00481716>

Submitted on 7 May 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

Discipline : Neurosciences

Soutenue publiquement par **Gaëlle MOISAND LACHENAL**

Vendredi 13 Novembre 2009

Amphithéâtre Serge Kampf, Institut des Neurosciences de Grenoble

**EXOSOMES NEURONAUX :
SECRETION DE PROTEINES MEMBRANAIRES
IMPLIQUEES DANS LES PROCESSUS
PHYSIOLOGIQUES
ET PATHOLOGIQUES DU SYSTEME NERVEUX**

Directeur de thèse : Pr Rémy Sadoul

Membres du jury :

Pr Stefan Nonchev (président du jury)

Dr Agnès Hémar (rapporteur)

Dr Pascal Legendre (rapporteur)

Pr Jacqueline Trotter (examinateur)

Pr Rémy Sadoul

Thèse préparée au sein du laboratoire :
Neurodégénérescence et plasticité, U836 INSERM/UJF
Grenoble Institut des Neurosciences



INTRODUCTION	
PREMIERE PARTIE : LA VOIE ENDOCYTAIRE	6
I. DE LA SURFACE CELLULAIRE A LA DEGRADATION	6
1. ENDOSOMES DE TRI	6
2. ENDOSOMES MULTIVESICULAIRES ET DEGRADATION	7
II. LES EXOSOMES	8
1. PREMIERES OBSERVATIONS	8
2. ORIGINE DES EXOSOMES	9
3. CARACTERISTIQUES	10
a) Protéines	10
b) Lipides	11
4. IN VIVO	12
5. REGULATION DE LA SECRETION DES EXOSOMES	13
a) Calcium	13
b) Activité cellulaire	14
6. FONCTIONS DES EXOSOMES	15
a) Voie alterne de sécrétion de protéines	15
b) Communication intercellulaire	16
▪ Transfert de protéines entre cellules	16
▪ Transfert d'ARN	20
c) Propagation de signaux de stress cellulaire	21
▪ Sécrétion des <i>Heat Shock Proteins</i>	21
▪ Régulation par p53	22
d) Exosomes et virus	23
7. PASSAGE DU MESSAGE EXOSOMAL DANS LA CELLULE « RECEPTRICE »	24
a) Interaction en surface	25
b) Internalisation des exosomes	26
III. MECANISMES MOLECULAIRES A LA BASE DE LA VOIE ENDOCYTAIRE	27
1. DEFORMATION MEMBRANAIRE	27
a) Vésicule d'endocytose	27
b) Vésicules intra-luminales	29
▪ Complexes ESCRT	29
▪ Rôle des lipides dans la formation des ILV	31
▪ Rôle des tétraspanines dans la formation des ILV	33
▪ Influence des protéines cargos sur la formation des ILV	34
2. FUSION MEMBRANAIRE	35
a) Reconnaissance et amarrage des membranes	36
▪ Les Vps de classe C	36
▪ Les petites GTPases monomériques Rab	36
b) Fusion des membranes par les SNARE	38
DEUXIEME PARTIE : LA VOIE ENDOCYTAIRE DANS LES NEURONES	42
I. DESCRIPTION	42
II. ENDOCYTOSE DES RECEPTEURS AU GLUTAMATE ET PLASTICITE SYNAPTIQUE	43
1. DESCRIPTION DES RECEPTEURS AU GLUTAMATE	43
2. LA PLASTICITE DE LA SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE	45
a) Epine dendritique et densité post-synaptique	45
b) Endocytose des récepteurs au glutamate	46
c) Exemple de plasticité synaptique : potentialisation et dépression à long terme	49
TROISIEME PARTIE : VOIE ENDOCYTAIRE ET MALADIES NEURODEGENERATIVES	50
I. ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES (EST)	51
1. DECOUVERTE D'UN NOUVEL AGENT INFECTIEUX	51
2. LA PrP DANS LA VOIE ENDOCYTAIRE	52
a) La PrP dans les radeaux lipidiques	52
b) La PrP dans les endosomes	53

II. MALADIE D'ALZHEIMER.....	54
1. LE PEPTIDE AMYLOÏDE ET SON PRECURSEUR L'APP	54
2. TOXICITE DE L'AB	56
a) <i>Aβ extracellulaire et dysfonctionnements synaptiques.....</i>	56
b) <i>Aβ intracellulaire et dysfonctionnements de la voie endocytaire.....</i>	57
3. PROCESSING DE L'APP DANS LA VOIE ENDOCYTAIRE	58
III. VOIE ENDOCYTAIRE ET PROPAGATION DE LA TOXINE DU TETANOS DANS LE SYSTEME NERVEUX.....	60
1. LA TOXINE DU TETANOS (TeNT) ET SON MECANISME D'ACTION	60
2. UTILISATION DE LA TeNT POUR REPERER LES CIRCUITS NEURONAUX.....	60
3. MECANISMES D'INTERNALISATION DE LA TOXINE DANS LES NEURONES	61
a) <i>Les récepteurs de surface.....</i>	61
b) <i>Les compartiments de transport.....</i>	62
4. PASSAGE TRANS-SYNAPTIQUE	63
QUATRIEME PARTIE : OBJECTIFS DE LA THESE	63

MATERIEL ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE	66
1. CULTURE PRIMAIRE.....	66
2. LIGNEES CELLULAIRES	67
3. TRANSFECTIONS.....	68
II. PURIFICATION DES EXOSOMES	69
1. CENTRIFUGATIONS DIFFERENTIELLES.....	69
2. FRACTIONNEMENT DES EXOSOMES SUR GRADIENT DE SUCROSE :.....	69
III. LYSATS CELLULAIRES	70
IV. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE - SDS (SDS PAGE)	71
V. WESTERN BLOT	71
VI. DOT-BLOT POUR LA DETECTION DU PEPTIDE AMYLOÏDE	73
VII. SEMI-QUANTIFICATION DES SIGNAUX PROTEIQUES A PARTIR DES WESTERN-BLOT. 73	
VIII. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	74
1. PREPARATION DES GRILLES	74
2. PREPARATION DES CULOTS EXOSOMAUX.....	74
3. PREPARATION DES CULTURES PRIMAIRES	75
4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE SUR TRANCHE D'HIPPOCAMPE.....	76
IX. STIMULATION DES CULTURES PRIMAIRES	77
1. MILIEUX CONTROLE ET DEPOLARISANT	77
2. AGENTS CHIMIQUES UTILISES SUR LES NEURONES	78
3. PROTOCOLE DES STIMULATIONS.....	78
X. GFP-TTC	79
1. PRODUCTION	79
2. INCUBATION SUR LES NEURONES.....	79
XI. MARQUAGE DES CELLULES AU PKH 67 (SIGMA).....	79
XII. SPECTROSCOPIE A CORRELATION DE FLUORESCENCE (FCS)	80

RESULTATS

ARTICLE 1 : SECRETION DES EXOSOMES PAR LES NEURONES CORTICAUX EN CULTURE. 89	
-------------------------------------------------------------------------------------	--

ARTICLE 2: LA SECRETION DES EXOSOMES PAR LES NEURONES MATURES EN CULTURE EST REGULEE PAR L'ACTIVITE SYNAPTIQUE GLUTAMATERGIQUE..... 109

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

I. NEURONES..... 114

1. CARACTERISATION DES EXOSOMES : SPECTROSCOPIE A CORRELATION DE FLUORESCENCE 114

2. FUSION DES ENDOSOMES MULTIVESICULAIRES AVEC LA MEMBRANE PLASMIQUE 115

a) *Essais in situ* 115

b) *Localisation de l'exocytose des MVB* 116

3. PASSAGE DES EXOSOMES ENTRE NEURONES 117

a) *Fixation des exosomes en surface*..... 117

b) *Internalisation des exosomes par les neurones*..... 117

II. SECRETION DE L'APP ET DE SES FRAGMENTS DANS LES EXOSOMES 120

1. LES BHK SECRETENT DES EXOSOMES 120

2. SECRETION DE L'APP ET DE SES FRAGMENTS C-TERMINAUX 120

3. LES MUTATIONS SWEDISH ET LONDON ALTERENT LA SECRETION DE L'APP ET DES CTF DANS LES EXOSOMES..... 122

4. L'INHIBITION DE LA Γ -SECRETASE AUGMENTE LA SECRETION DES CTF ISSUS DE L'APP SWEDISH 123

DISCUSSION

I. LES NEURONES SECRETENT DES EXOSOMES 125

II. LA SECRETION DES EXOSOMES NEURONAUX EST REGULEE 127

III. QUEL(S) ROLE(S) POUR LES EXOSOMES NEURONAUX ?..... 129

1. EVACUATION DE MATERIEL A PARTIR DE LA SYNAPSE..... 129

2. MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE 130

3. PROPAGATION DE MESSAGES PATHOGENES A TRAVERS L'ORGANISME 132

a) *Propagation du Prion* 132

b) *Maladie d'Alzheimer*..... 134

c) *Propagation de neurotoxines*..... 136

d) *Propagation de virus neurotropes* 137

e) *Autres maladies neurodégénératives* 137

4. COMMUNICATION ENTRE CELLULES GLIALES ET NEURONES 139

a) *Rôle des exosomes dans la protection des neurones*..... 139

b) *Transfert d'ARN entre cellules gliales et neurones*..... 141

5. ROLE POSSIBLE DES EXOSOMES DANS LE DEVELOPPEMENT 143

IV. INTERACTION AVEC LES CELLULES CIBLES 144

1. LES EXOSOMES ONT-ILS UNE CIBLE CELLULAIRE SPECIFIQUE ? 144

2. QUEL MECANISME D'INTERACTION EN SURFACE ? 145

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 147

Principales abréviations

- ☞ AICD : amyloid intracellular domain
- ☞ APP : amyloid precursor protein
- ☞ ATP : Adénosine triphosphate
- ☞ BAPTA-AM : 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acide tetrakis couplé à une groupement acétoxy-méthyl ester
- ☞ BMP : bis monoacylglycérol phosphate (autre nom : LBPA)
- ☞ CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
- ☞ CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
- ☞ CTF : C-terminal fragment of APP
- ☞ DOC : Déoxy-cholate
- ☞ DRM : detergent resistant membrane
- ☞ EEA-1 : early endosomal antigene-1
- ☞ EGF : epidermal growth factor
- ☞ EGTA-AM : Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid – acétoxy-méthyl ester
- ☞ FGF : fibroblast growth factor
- ☞ GABA : acide γ -aminobutyrique
- ☞ HPTS : 8-hydroxypyrrène-1, 3, 6-trisulfonique acid
- ☞ I-CAM : intercellular adhesion molecule
- ☞ ILV: intraluminal vesicles
- ☞ LAMP 1 et 3 : lysosomal associated membrane protein
- ☞ LBPA : lyso-*bis*-phosphatidic acid, (autre nom : BMP)
- ☞ LFA-1 : leucocyte function-associated molecule 1
- ☞ MK-801 : Dizocilpine hydrogen maleate, (5R, 10S)-(+)-5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate
- ☞ MVB : multivesicular bodies
- ☞ MVE : multivesicular endosomes
- ☞ PFA : paraformaldéhyde
- ☞ PI(3)K : phospho-inositide 3 kinase
- ☞ PI(3)P : phosphatidyl-inositol 3 phosphate
- ☞ Prion : proteicaneous infectious particles
- ☞ PVDF : polyvinyl diméthyl Fluoride
- ☞ SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
- ☞ TfR : récepteur à la transferrine
- ☞ TNF : tumour necrosis factor

Première partie : La voie endocytaire

I. De la surface cellulaire à la dégradation

L'expression des protéines transmembranaires à la surface des cellules est la résultante d'un équilibre entre les mécanismes d'apport et de dégradation. L'apport est assuré par la voie de synthèse et de sécrétion, et le retrait par la voie endocytaire (fig. 1). Ces deux mécanismes jouent un rôle déterminant dans de nombreux processus biologiques, en régulant les interactions de la cellule avec son environnement extérieur.

1. Endosomes de tri

Les protéines membranaires, après leur traduction dans le réticulum endoplasmique, mûrissent dans l'appareil de Golgi, puis sont envoyées dans des vésicules de sécrétion qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les protéines membranaires se retrouvent alors ancrées à la surface cellulaire. Ces protéines, mais aussi les lipides de la membrane, subissent ensuite un renouvellement constant. Ils sont internalisés dans des vésicules d'endocytose, et envoyés vers les endosomes précoces, compartiments dans lesquels s'effectuera un tri des protéines « à dégrader » et des protéines « à recycler » (fig. 2). Les endosomes précoces sont caractérisés par une forme tubulo-vésiculaire décrite pour la première fois à la fin des années 1980 (Geuze et al, 1987, Gruenberg et al, 1989) (fig. 3). A ce niveau, la voie par défaut est la voie du recyclage vers la membrane plasmique. Les éléments destinés à être recyclés se concentrent dans les parties tubulaires de l'endosome précoce qui se détachent pour donner les endosomes de recyclage. En revanche, les protéines qui portent un signal positif de dégradation vont au contraire s'accumuler dans la partie vacuolaire de l'endosome précoce. Elles sont regroupées dans des zones de membrane d'où bourgeonnent des vésicules (ILV, *intraluminal vesicles*) qui se détachent dans le lumen de l'endosome. Cette partie vésiculaire donne naissance aux corps multivésiculaires (MVB, *multivesicular bodies*), compartiments intermédiaires de transport entre les endosomes de tri et les compartiments de dégradation.

2. Endosomes multivésiculaires et dégradation

Les premières observations de compartiments multivésiculaires en provenance des endosomes précoces datent de la fin des années 80 (Gruenberg et al, 1989, Aniento et al, 1993). Les chercheurs observent l'existence d'intermédiaires multivésiculés entre les endosomes précoces et les compartiments plus tardifs. Ces compartiments de transport ne peuvent ni fusionner entre eux, ni avec les endosomes précoces, mais ont la capacité de fusionner avec les compartiments tardifs, de manière dépendante des microtubules.

Les corps multivésiculaires mesurent 200 à 500nm de diamètre et sont remplis de vésicules intraluminales d'une taille de 50 à 100nm (fig. 3). En 2008, Falguières et al ont purifié des endosomes sur gradient de sucrose à partir de surnageants post-nucléaires (PNS) de cellules BHK-21 (*baby hamster kidney*), et ont mesuré l'incorporation d'un marqueur fluorescent, le HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique acid), à l'intérieur de ces endosomes. Par cette méthode, ils évaluent que le $t_{1/2}$ de formation d'une ILV serait approximativement de 7,5 minutes.

▪ *Lipides et protéines caractéristiques :*

- Les MVB concentrent certains lipides par rapport aux autres membranes de la cellule, comme le PI(3)P (Phosphatidyl Inositol 3-phosphate), des sphingolipides (gangliosides (GM1) et céramides) et le cholestérol. Il existe également une grande richesse en LBPA (lyso-bis-phosphatidic acid), qui semble exclusivement présent dans les MVB. La présence de ces lipides rendrait la membrane des ILV sensible aux hydrolases acides contenues à l'intérieur des lysosomes et faciliterait ainsi leur dégradation (Piper et al, 2007).

☀ Le PI(3)P est enrichi du côté cytosolique de la membrane limitante du MVE et aussi dans les ILV. Le PI(3)P est observé dans les endosomes plutôt précoces, et il disparaît plus tardivement dans la voie.

☀ La concentration du LBPA (également appelé BMP pour bis monoacylglycérol phosphate) augmente de 1 à 15% entre les endosomes précoces et tardifs dans la lignée BHK (*baby hamster kidney*). En 2006, une étude de White et al montre qu'il existerait en réalité plusieurs classes de MVB, de morphologie similaire mais certains seraient riches en LBPA, et d'autres n'en contiendraient pas.

- ✿ La plupart du cholestérol présent aux endosomes est envoyé dans les vésicules intraluminales (Wubbolts et al, 2003).

- Parmi les protéines enrichies dans les endosomes multivésiculaires, on trouve Lamp1 (*lysosomal associated membrane protein 1*), plusieurs petites GTPases monomériques dont Rab7, des tétraspanines (protéines à 4 domaines transmembranaires) comme CD63 (également appelée Lamp3).

Les MVE migrent de la périphérie vers le centre de la cellule le long des microtubules grâce à leur association avec la dynéine, un moteur moléculaire qui les ancre sur les microtubules. Le cytosquelette d'actine jouerait également un rôle dans cette mobilité. Dans la littérature, la distinction entre MVB et endosomes tardifs n'est pas bien claire. Les MVB sont décrits soit comme des compartiments intermédiaires entre endosomes précoces et tardifs, soit comme des compartiments capables de fusionner directement avec les lysosomes. Endosomes tardifs et MVB peuvent être regroupés sous le terme d'endosomes multivésiculaires (MVE). La fusion des MVE avec les lysosomes aboutit à la destruction des vésicules intra-luminales et de leur contenu. La concentration des protéines à dégrader dans ces ILV permet de les mettre directement en contact avec les hydrolases qui se trouvent dans le lumen du lysosome.

En marge de cette voie classique de dégradation, il a été montré que les endosomes multivésiculaires peuvent également fusionner avec la membrane plasmique, déversant les microvésicules qu'ils contiennent dans le milieu extracellulaire (fig. 2). Ces microvésicules retrouvées dans les fluides extracellulaires et provenant de compartiments intracellulaires endosomaux sont appelées exosomes.

II. Les exosomes

1. Premières observations

En 1981, Trams et al décrivent des microvésicules de 40nm environ sécrétées par plusieurs types cellulaires placés en culture *in vitro* (Gliome C-6, neuroblastome N-18). Elles sont enrichies en sphingolipides et en phospholipides polyinsaturés. La composition lipidique et protéique de ces vésicules diffère significativement de la membrane plasmique, ce qui suggère qu'elles ont une origine différente. Les cellules libèrent dans ces microvésicules certaines activités enzymatiques, comme la 5' nucléotidase, une enzyme ancrée dans la

membrane par un groupement GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol), qui clive les nucléotides extracellulaires en nucléosides perméables aux membranes. Cette équipe est la première à suggérer le terme d'exosomes pour désigner ces microvésicules sécrétées par les cellules dans le milieu extracellulaire et qui ne proviendraient pas directement de la surface cellulaire.

2. Origine des exosomes

L'origine endocytaire de ces microvésicules est avancée en 1985, lorsque les premières figures de l'exocytose de vésicules d'une cinquantaine de nanomètres sont observées en microscopie électronique dans des cultures de réticulocytes chez le mouton (Pan et al, 1985). L'endocytose du récepteur à la transferrine (TfR) est suivie grâce à un marquage en surface par des billes d'or. Le marquage se concentre dans les microvésicules à l'intérieur de MVE, tandis qu'il n'est plus présent à la membrane limitante. Ils observent que certains MVE fusionnent avec la membrane plasmique, et libèrent ainsi dans le milieu extracellulaire les vésicules de 50 à 100nm portant les TfR marqués avec les billes d'or (fig. 4). Ce processus intervient lors de la maturation des réticulocytes et permet la sécrétion du TfR, mais également de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme couplée à une ancre GPI. Johnstone et al émettent l'hypothèse que la sécrétion des exosomes représenterait pour ces cellules un moyen de se débarrasser de protéines membranaires dont elle n'a plus besoin et de pallier ainsi à la perte des lysosomes qui se produit lors de leur maturation (Johnstone et al, 1987).

Cependant, en 2006, une équipe qui travaille sur la lignée de lymphocytes T Jurkat, a observé la formation de vésicules rassemblant toutes les caractéristiques exosomales, à partir de la surface cellulaire. La membrane plasmique rassemblerait dans des micro-domaines des protéines endosomales et exosomales (CD63, CD81, Lamp1, et Alix). Des coupes de ces cellules observées en microscopie électronique montrent parfois un « *budding* » de la membrane plasmique vers l'extérieur, d'une centaine de nanomètres de diamètre, à partir de ces micro-domaines (Booth et al, 2006). Ces résultats suggèrent que dans certains types cellulaires, la membrane plasmique pourrait donner naissance directement à des vésicules apparentées aux exosomes, en rassemblant les éléments nécessaires à la formation des ILV des endosomes.

3. Caractéristiques

Il existe plusieurs types de vésicules membranaires sécrétées par les cellules (fig. 5). Les microvésicules et les particules membranaires sont directement formées à partir de la membrane plasmique, au contraire des exosomes qui ont pour origine les endosomes. La distinction entre ces vésicules qui sont toutes retrouvées dans le milieu extracellulaire est basée sur leurs caractéristiques à la fois morphologiques, protéomiques et lipidomiques.

Les exosomes se distinguent par leur taille (de 30 à 100nm en fonction des cellules), et par une forme particulière et homogène, ronde et aplatie au centre (en « hématie », fig. 6). Ils flottent sur gradient de sucrose à une densité comprise entre 1.12 et 1.19 g/ml. Enfin, de part leur origine endosomale, ils contiennent des protéines et des lipides caractéristiques distincts de la membrane plasmique.

a) Protéines

En 1986, Kassis et al purifient des exosomes à partir de surnageants de gliomes de rat. Ils mettent en évidence la présence de protéines G fonctionnellement actives et de récepteurs membranaires β -adrénergiques. Les années suivantes, différentes équipes décrivent la sécrétion d'exosomes par de plus en plus de types cellulaires, comme les cellules du système immunitaire et les cellules épithéliales. De nombreuses protéines sont retrouvées dans les exosomes. Certaines sont spécifiques du type cellulaire, d'autres sont communes à tous les exosomes quelque soit la cellule qui les sécrète. Les exosomes ne contiennent pas de protéines nucléaires, mitochondriales, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi.

En 2009, Théry et al (*J. Immunol.*) proposent un schéma récapitulatif des principales protéines trouvées dans les exosomes sécrétés par tous les types cellulaires répertoriés dans la littérature, et retrouvés dans des fluides biologiques (fig. 7). Dans 50% des études sur les exosomes, ont été trouvées :

- des protéines d'adhésion: MFG-E8 (*milk fat globule-EGF factor VIII*) et intégrines
- des tétraspanines
- les molécules impliquées dans la présentation d'antigène : CMH I (et CMH II dans 30% des exosomes répertoriés dans la littérature)
- des chaperonnes : Hsp70, Hsp90

- des molécules du cytosquelette ou associées au cytosquelette : Actine, Tubuline, protéine ERM (Ezrine, radixine et moésine)
- des protéines de signalisation intracellulaire : Protéine G α , 14-3-3
- des protéines impliquées dans le trafic membranaire : des GTPases monomériques Rab, et des annexines
- des protéines impliquées dans la voie endocytaire : Alix, la clathrine, Tsg101 et la flotilline.
- des protéines impliquées dans l'initiation de la synthèse protéique : EEF1A1 (*Eukaryotic translation elongation factor*)
- des enzymes du métabolisme cellulaire: pyruvate kinase, GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase-activating protein*)

Parmi les protéines recensées dans les exosomes, on peut distinguer celles qui sont spécifiquement enrichies dans les fractions exosomales par rapport aux autres vésicules sécrétées par les cellules : la flotilline, Alix, CD63 (tétraspanine), et Tsg101. Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de formation des ILV à l'intérieur des MVB, et seront détaillées dans le paragraphe III, Mécanismes moléculaires à la base de la voie endocytaire (page 28). On compte également hsp70 et le récepteur à la transferrine parmi les protéines enrichies dans les exosomes. Dans les expériences, ces protéines sont classiquement utilisées comme marqueurs exosomaux.

b) Lipides

Subra et al en 2007 ont détaillé la composition lipidique d'exosomes provenant de divers types cellulaires Leur but était de reconstituer des « exosomes de synthèse », pour pouvoir véhiculer des molécules curatives. Leur étude a permis de montrer qu'il existe des différences en fonction de l'origine cellulaire des exosomes. On peut cependant retrouver entre les exosomes une richesse commune en :

- phospholipides : les exosomes contiennent beaucoup de phospholipides saturés, de phosphatidyl-éthanolamine et des glycéro-phospholipides
- sphingolipides : on trouve la sphingomyéline, des céramides (Trajkovic et al, 2008), et des gangliosides (GM1, GM3)

- cholestérol : les exosomes sont particulièrement riches en cholestérol. L'enrichissement par rapport à la membrane plasmique varie en fonction des types cellulaires

La présence de LBPA dans les exosomes est controversée. Une équipe a détecté des microvésicules d'une centaine de nanomètres attachées à la surface de cellules dendritiques folliculaires en culture, qui contiennent des tétraspanines et du LBPA (Denzer et al, 2000). Cependant, d'autres analyses lipidomiques d'exosomes, réalisées à partir de surnageants de lymphocytes B, montrent qu'ils ne contiennent pas de LBPA (Wubbolts et al, 2003, Subra et al, 2006).

De même que pour les protéines exosomales, ces lipides sont impliqués dans les processus de formation des exosomes au niveau des endosomes multivésiculaires et seront détaillés dans la partie III, p. 28).

4. In vivo

La grande majorité des travaux sur les exosomes est réalisée sur des cellules en culture. Plus récemment, des vésicules avec des caractéristiques protéomiques, densitométriques et morphologiques similaires aux exosomes sécrétés *in vitro* ont été retrouvées dans divers fluides biologiques. Les recherches dans ce domaine visent essentiellement à trouver des marqueurs de pathologies détectables d'une manière non invasive pour les patients.

- le liquide séminal collecté dans l'épididyme de bélier adulte contient des vésicules de taille homogène d'une cinquantaine de nanomètres, contenant des protéines à ancre GPI (Gatti et al, 2005).

- le liquide cérébro-spinal (céphalo-rachidien) prélevé chez la brebis contient des exosomes portant la protéine du Prion cellulaire PrP (Vella et al, 2008).

- le plasma sanguin humain contient également des vésicules rassemblant les caractéristiques exosomales, et contenant un récepteur au TNF (TNFR1, *Tumor Necrosis Factor Receptor*), impliqué dans les mécanismes de mort cellulaire, ainsi qu'un récepteur

nucléaire appelé PPAR (*Peroxisome proliferator activated receptor*) qui joue un rôle dans la différenciation et la prolifération des adipocytes (Looze et al, 2009).

- on peut trouver dans l'urine humaine des exosomes renfermant des protéines marqueurs du cancer de la vessie et de nombreux autres syndromes (Pisitkun et al, 2004).

Même si la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique n'a pas encore été montrée *in vivo*, la présence dans les fluides biologiques de vésicules rassemblant les caractéristiques exosomales montre que la sécrétion des exosomes n'est pas un artefact de culture comme certains l'avaient envisagé au départ.

5. Régulation de la sécrétion des exosomes

a) Calcium

Plusieurs études suggèrent très fortement que le calcium intracellulaire jouerait un rôle dans l'étape de fusion des MVE avec la membrane plasmique.

P2X7R est un récepteur-canal à purines de la famille des P2X. Ces récepteurs ubiquitaires sont présents à la membrane plasmique, et peuvent être activés par l'ATP extracellulaire (Rassendran et al, 1997). Leur activation ouvre un canal laissant entrer le calcium et le sodium, ce qui dépolarise la membrane de la cellule et déclenche des mécanismes intracellulaires calcium-dépendants. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreux phénomènes, comme la contraction cardiaque ou le tonus vasculaire. Ils interviennent également dans le système immunitaire, en stimulant la production d'interleukines ou en actionnant la lyse de cellules infectées par des bactéries. L'activation de ce récepteur par incubation de macrophages en cultures avec de l'ATP stimule en 15 minutes la sécrétion d'exosomes. La même expérience réalisée sur des macrophages provenant de souris KO pour le gène de P2X7R ne provoque pas d'augmentation de la sécrétion des exosomes (Qu et al, 2009). Le fait que les exosomes aient été récoltés après des temps relativement courts suggère que l'augmentation de calcium cytosolique permet d'augmenter directement la fusion des MVE existants dans la cellule avec la membrane plasmique.

D'autres études se sont également intéressées au rôle du calcium dans la sécrétion des exosomes, mais sur des temps cette fois plus longs. Dans la lignée K562, l'incubation des cellules pendant 7 à 15h avec les ionophores A23187 (spécifique du calcium) ou la monensine (ionophore du Na^+ et du Ca^{2+}) augmente la sécrétion de marqueurs exosomaux, et à l'inverse, l'utilisation du chélateur de calcium intracellulaire BAPTA-AM diminue cette sécrétion (Savina et al, 2005). Enfin, la régulation de la sécrétion exosomale par le calcium a aussi été démontrée dans les cellules du trabéculum de l'œil. Ces cellules, situées entre la cornée et l'iris, libèrent des exosomes contenant une protéine appelée Myociline, dont des mutations sont en cause dans les cas de glaucomes. L'incubation de ces cellules mises en culture avec la ionomycine, un autre ionophore pour le calcium, provoque une augmentation de la sécrétion d'exosomes (Hoffman et al, 2009). Une élévation du calcium intracellulaire semble donc accroître la production d'exosomes par ces cellules.

Le calcium contenu dans le réticulum endoplasmique pourrait également intervenir. La thapsigargine, qui bloque la recapture du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique, augmente la concentration en calcium dans le cytosol et accroît fortement la sécrétion des exosomes. De même, la fixation de la transferrine sur son récepteur active la phospholipase C, ce qui produit de l'IP3 (Inositol 1, 4, 5-triphosphate) dans le cytosol et provoque la libération de calcium à partir du réticulum et augmente la quantité d'exosomes sécrétés (Savina et al, 2003).

L'ensemble de ces résultats suggère une implication du calcium, d'origine soit extracellulaire, soit intracellulaire, dans la production des exosomes. Le calcium pourrait intervenir à différents niveaux : au moment de la genèse des ILV dans l'endosome, et dans les étapes nécessaires à la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique.

b) Activité cellulaire

Dans le cas des lymphocytes B, la production d'exosomes est sous la dépendance de cytokines (Interleukine 4, ou IL-4) et de l'activation de récepteurs de surface (CD40, BCR (*B cell Receptor*)). Les cellules ne sécrètent pas d'exosomes tant que le récepteur de l'IL-4 et la molécule de co-stimulation CD40 ne sont pas activés. La production et/ou la sécrétion des exosomes seraient donc stimulées ici par des contacts intercellulaires, directs ou à distance, qui activent la cellule (Saunderson et al, 2008).

Arita et al en 2008 ont de leur côté montré que les contacts intercellulaires entre lymphocytes T et B, ou la stimulation des lymphocytes B par incubation avec des immunoglobulines de type IgM, stimulent leur production d'exosomes. Au niveau intracellulaire, une inhibition de la voie NFκB, qui est une voie de signalisation commune aux stimuli extracellulaires précédents, réduit la sécrétion de marqueurs exosomaux et des molécules du CMH associées aux exosomes (Arita et al, 2008).

Ces mécanismes de régulation relient très clairement l'activité des lymphocytes B à la production des exosomes. La stimulation des lymphocytes par les cytokines, ou par contacts intercellulaires, et l'activation de la voie NFκB impliquée dans la survie et la croissance cellulaire, déclenchent une augmentation de la production des exosomes.

6. Fonctions des exosomes

Durant ces vingt dernières années, de nombreuses études ont révélé que la plupart des cellules en culture sécrètent des exosomes, comme par exemple les plaquettes (Heijnen et al, 1999), les cellules endothéliales (Van Niel et al, 2003), de nombreuses cellules du système immunitaire, et les cellules tumorales. L'étude de la sécrétion des exosomes dans ces systèmes a révélé que les exosomes n'ont pas seulement un rôle d'évacuation de protéines obsolètes comme cela semble être le cas pour les réticulocytes, mais qu'ils peuvent également jouer un rôle clé dans la communication intercellulaire et la propagation de divers messages à travers l'organisme.

a) Voie alterne de sécrétion de protéines

La voie classique de sécrétion des protéines par les cellules se fait via le réseau trans-golgien. Les protéines destinées à être sécrétées possèdent un peptide signal, qui est reconnu par une SRP (*signal recognition particle*) lors de la traduction de la protéine par les ribosomes dans le cytosol. La SRP possède un récepteur au niveau du réticulum endoplasmique, et la fixation du complexe protéine-ribosome-SRP sur ce récepteur provoque la translocation de la protéine dans le lumen du réticulum. La protéine transite ensuite du réticulum à l'appareil de Golgi, où elle subira une maturation post-traductionnelle, puis sera envoyée dans les vésicules de sécrétion qui se forment à partir de la membrane du Golgi. Les vésicules de sécrétion

fusionnent avec la membrane plasmique, libérant dans le milieu extracellulaire les protéines solubles, et apportant à la membrane plasmique les protéines membranaires.

Il existe cependant des protéines qui sont sécrétées par les cellules mais qui ne possèdent pas de peptide signal, qui sont donc traduites dans le cytosol et sont sécrétées par une voie alterne indépendante de l'appareil de Golgi.

L'interleukine 1 (IL-1) est une cytokine sécrétée par les monocytes et les macrophages, deux cellules du système immunitaire, lors d'une réponse inflammatoire. Il en existe deux variants, α et β , et tous deux ne possèdent pas de peptide signal dans leur séquence. En 1990, Rubartelli et al montrent que l'IL-1 β est sécrétée par une voie indépendante de la voie classique de sécrétion empruntée par d'autres cytokines (IL-6, TNF α). La sécrétion d'IL-1 β serait en revanche stimulée par une augmentation du calcium cytosolique. En 1999, Andrei et al réalisent des purifications de compartiments endocytaires et remarquent que l'IL-1 β colocalisent avec le marqueur endosomal Lamp1 (*lysosomal associated membrane protein 1*). Puis en 2007, Qu et al avancent l'hypothèse que l'IL-1 β pourrait être emmenée dans les ILV lors de leur formation et donc par la suite sécrétée par la voie exosomale. En effet, ils observent que la sécrétion d'IL-1 β est régulée par la stimulation de P2X7R, et suit la sécrétion des exosomes.

Le FGF-2 (*fibroblast growth factor*) est également sécrété par les cellules suivant une voie non classique. Il intervient dans la prolifération cellulaire pendant l'embryogénèse, mais aussi lors de l'angiogénèse tumorale. Il ne possède pas de peptide signal, mais pourtant une forme courte du FGF-2 de 18kDa est sécrétée par de nombreuses tumeurs. Sa sécrétion semble être dépendante de l'ATP (Ceccarelli et al, 2007). En immunofluorescence, le FGF-2 colocalise avec CD63 qui marque les endosomes tardifs. Enfin, en immunogold, Ceccarelli et al ont montré la présence de FGF-2 dans les MVB et les exosomes des cellules tumorales, en colocalisation avec hsp70.

b) Communication intercellulaire

▪ Transfert de protéines entre cellules

De plus en plus d'études montrent que les cellules sont capables de s'échanger des protéines membranaires et solubles par la voie exosomale. En particulier, les cellules

immunitaires sécrètent des exosomes qui leur permettent de déclencher entre elles des réponses spécifiques. D'autre part, les cellules tumorales sécrètent des exosomes capables *in vivo* d'interférer avec le système immunitaire afin d'empêcher la mise en place d'une réponse anti-tumorale.

✿ *Activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale*

Le système immunitaire est constitué de deux barrières : l'immunité innée, représentée par des cellules capables de phagocyter la plupart des pathogènes qui entrent dans l'organisme (macrophages, cellules dendritiques), et l'immunité spécifique, due aux lymphocytes B et T. L'activation des lymphocytes T est restreinte par la présentation des antigènes (Ag) en association avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et II. Le déclenchement de la réponse immune spécifique se fait au niveau des cellules présentatrices d'antigène (CPA), comme les lymphocytes B et les cellules dendritiques, qui sont capables d'apprêter les antigènes et de les présenter à leur surface en association avec du CMH I ou II pour activer les lymphocytes T. Les LT sont de deux types : les $CD4^+$, ou LT *helper*, sont activés par des complexes Ag-CMH II, et vont sécréter des cytokines pour orchestrer la réponse immunitaire spécifiquement contre l'antigène. Les LT $CD8^+$, ou LT cytotoxiques, sont activés par les Ag présentés sur des CMH I, et vont ensuite induire la destruction des cellules infectées par exemple par un virus.

La première étude sur les exosomes sécrétés par les cellules immunitaires a été réalisée en 1996 par Raposo et al. L'équipe observe qu'une lignée de lymphocytes B en culture sécrète des exosomes, qui contiennent des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les exosomes sécrétés par cette lignée de lymphocytes B incubée avec des antigènes provenant de mycobactéries sont capables à eux seuls d'activer la prolifération de lymphocytes T $CD4^+$ en culture, tandis que des exosomes sécrétés par des cellules B naïves n'induisent pas cette prolifération. Ces résultats précurseurs ont montré que les exosomes étaient porteurs de messages qu'ils pouvaient transmettre entre les cellules.

Les années suivantes, d'autres chercheurs se sont intéressés aux mastocytes, qui sont des cellules à granules du système immunitaire inné, dispersées dans les tissus de l'organisme, et impliquées en particulier dans les phénomènes allergiques. Ces cellules sécrètent des exosomes qui contiennent des molécules de classe II (CMH II), les protéines chaperonnes

hsp60 et 70, des facteurs de co-stimulation (CD86), et les protéines d'adhésion cellulaire LFA-1 (*leucocyte function-associated molecule 1*) et I-CAM (*intercellular adhesion molecule*) (Skokos et al, 2001). Lorsque les mastocytes sont incubés *in vitro* avec un antigène, cet antigène est ensuite sécrété par les exosomes, en association avec les chaperonnes hsp60 et hsp70. *In vivo*, l'administration à des souris naïves d'exosomes de mastocytes préincubés avec un antigène provoque une maturation des cellules dendritiques, qui augmentent leur production de CMH II et de facteurs de co-stimulation. Les cellules dendritiques sont ensuite capables d'activer des lymphocytes en leur présentant les peptides qui ont été apportés par les exosomes (Skokos et al, 2003). Cette implication des mastocytes dans la mise en route de l'immunité spécifique n'avait encore jamais été décrite. De plus, cette étude montre que les exosomes peuvent transférer des protéines à des cellules qui sont capables de les utiliser pour déclencher une réponse immunitaire.

Une grande partie des études sur les exosomes sécrétés par les cellules du système immunitaire porte sur les cellules dendritiques (DC), qui ont un rôle central dans le déclenchement de la réponse immune. A l'état immature, elles interviennent dans l'immunité innée, en phagocytant les pathogènes et en les éliminant. Lorsqu'elles sont activées, elles présentent les complexes antigènes-CMH aux lymphocytes T pour permettre le déclenchement de la réponse spécifique. En 1998, une étude a montré pour la première fois que ces cellules sécrétaient des exosomes. Des cellules dendritiques immatures en culture, incubées avec un antigène, l'endocytent, et sécrètent des exosomes qui portent des molécules du CMH I et II fonctionnelles associées à l'antigène, ainsi que des facteurs de co-stimulation (CD80 et CD86) nécessaires à l'activation de la réponse immunitaire.

En 2002, Théry et al ont montré que des cellules dendritiques n'exprimant pas de CMH II étaient néanmoins capables d'activer des lymphocytes T CD4⁺ si elles avaient été pré-incubées avec des exosomes sécrétés par des cellules dendritiques normales. Les exosomes leur ont donc apporté les complexes CMH II – peptides qui leur manquaient pour activer les lymphocytes. Ces résultats montrent que les exosomes permettent le transfert de protéines fonctionnellement actives, à distance, entre diverses cellules du système immunitaire, et qu'ils sont ainsi capables de participer au déclenchement d'une réponse immune.

Ce transfert de protéines entre cellules dendritiques via les exosomes est d'une importance capitale en particulier dans l'immunité anti-tumorale. En effet, les tumeurs sont capables de développer des systèmes de défense et de camouflage dans l'organisme, qui

rendent souvent impossible le déclenchement d'une réponse anti-tumorale efficace. Or l'équipe de Laurence Zitvogel, à Paris, a eu l'idée d'utiliser le potentiel immuno-déclencheur des exosomes de cellules dendritiques pour lutter contre les tumeurs. *In vitro*, des DC prélevées chez une souris porteuse d'une tumeur sont incubées avec des peptides issus de cette tumeur. Les exosomes sécrétés par ces cellules dendritiques sont ensuite ré-injectés en sous-cutané à la souris. Les chercheurs observent après 60 jours une activation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiquement dirigée contre la tumeur, et une suppression de la progression tumorale, voire le rejet de la tumeur. De plus, les animaux gardent une mémoire de cette immunité spécifique, qui leur permet d'être protégée à long terme contre la tumeur (Zitvogel et al, 1998).

Les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques *in vitro* sont aujourd'hui à la base de l'élaboration de vaccins anti-tumoraux autologues chez l'humain, actuellement en essais cliniques de phase I (évaluation des doses à administrer et des effets indésirables à court terme). Des résultats encourageants ont été obtenus pour les mélanomes, le cancer de la prostate ou du poumon, et certains lymphomes folliculaires (Zitvogel L, *Nouveaux outils de vaccination antitumorale : exosomes et immunothérapie génique par cellules dendritiques*). Ainsi, chez des patients atteints de mélanome métastatique, l'injection d'exosomes recouverts d'antigènes de mélanome provoque une régression de la tumeur cutanée et la disparition des foyers métastatiques.

Sécrétion d'exosomes par les tumeurs

Les cellules tumorales sécrètent des exosomes, d'une taille comprise entre 60 et 90nm, portant des molécules du CMH I, Hsp70, Lamp1, et des protéines spécifiques de la tumeur (Wolfers et al, 2001). Les exosomes sécrétés par les cellules tumorales peuvent participer à la progression tumorale, en favorisant par exemple l'irrigation du foyer tumoral, ou en supprimant la réponse immunitaire. Des cellules d'une tumeur gastrique humaine ont été mises en culture, puis les exosomes sécrétés par ces cellules ont été incubés sur d'autres cellules qui provenaient soit de la même tumeur, soit d'une tumeur gastrique d'un autre individu. Il a été constaté une augmentation significative de la croissance cellulaire dans les deux cas. Cette activité proliférative pourrait être due à une stimulation des voies PI3K/Akt (*phosphoinositide 3-kinase*) et MAPK/ERK (*Mitogene activated protein kinase/extracellular regulated protein kinase*) dans les cellules receveuses, car l'incubation des cellules avec les

exosomes tumoraux provoque une augmentation de la phosphorylation de Akt et de ERK1/2 (Qu et al, 2009).

En 2008, Al-Nedawi et al observent qu'au sein d'un gliome humain, l'expression d'un variant tronqué du récepteur à l'EGF (EGFRvIII) ayant un pouvoir oncogénique, n'est pas homogène : certaines cellules l'expriment tandis que d'autres en sont dépourvues. Les exosomes purifiés à partir des cellules EGFRvIII-positives mises en culture contiennent cette protéine oncogénique. Lorsqu'ils sont incubés sur les cellules négatives pour EGFRvIII, ils y induisent l'expression de la protéine oncogénique à leur surface, et l'activation de signaux de croissance cellulaire. Les exosomes permettent donc un échange de protéines entre cellules tumorales, et par ce biais ils pourraient représenter un vecteur de propagation du phénotype cancéreux entre cellules.

De plus, les exosomes sécrétés par certaines tumeurs sont capables de réprimer la différenciation des monocytes du sang circulant en cellules dendritiques fonctionnelles, ou de provoquer leur maturation en DC inactives n'exprimant pas ou peu de CMH II. Les exosomes des tumeurs contiennent des molécules antiprolifératives, comme le TGF β (*tumour growth factor β*) (Clayton et al, 2007). Enfin, les exosomes sécrétés par certaines tumeurs (mélanomes et cancers colorectaux) portent des molécules qui induisent directement la mort des lymphocytes T, comme FasL (*Fas Ligand*, également appelé *Tumour necrosis factor ligand superfamily member 6*), dont l'interaction en surface avec son récepteur Fas déclenche l'apoptose (Iero et al, 2008).

▪ **Transfert d'ARN**

Les exosomes sécrétés par les mastocytes contiennent des ARNs. Des ARN messagers (ARNm) codés par 1300 gènes ont été retrouvés, dont 270 se trouvent spécifiquement dans les exosomes et non dans les cellules d'où ils proviennent. Cent vingt microARNs ont également été caractérisés dans ces exosomes, eux-aussi enrichis par rapport au cytoplasme. Les microARNs sont des ARN de petite taille (jusqu'à une trentaine de nucléotides) jouant un rôle dans la répression de la traduction des ARNm : ils peuvent s'apparier aux ARNm et les amener vers la dégradation ou la séquestration.

Lorsque des exosomes de mastocytes de souris sont ajoutés sur des mastocytes humains en culture, les cellules humaines se mettent à exprimer les protéines de souris codées

par les ARNm apportés par les exosomes. Ces résultats démontrent que les ARNm présents à l'intérieur des exosomes ont été transloqués vers le cytosol pour y être traduits.

Le transfert d'ARNm entre cellules par voie exosomale a également été observé par Skog et al, en 2008. Des cellules de glioblastome en culture sécrètent des exosomes contenant des ARNm, qui sont capables d'être repris par des cellules vasculaires endothéliales. Les cellules endothéliales expriment ensuite les protéines codées par ces ARNm. Or les chercheurs ont remarqué que l'addition des exosomes du glioblastome sur les cellules endothéliales provoque une augmentation de la prolifération de ces cellules. Un des ARNm particulièrement enrichi dans les exosomes du glioblastome code pour l'EGFR (*endothelial growth factor receptor*), impliqué dans la prolifération des cellules endothéliales. Le glioblastome pourrait ainsi par la voie exosomale, favoriser la néo-angiogénèse à partir des vaisseaux qui l'entourent.

c) Propagation de signaux de stress cellulaire

▪ Sécrétion des *Heat Shock Proteins*

Les exosomes représentent une voie de sécrétion de protéines associées au stress cellulaire, comme la protéine Hsp70 (*Heat shock protein 70*). Par exemple, les cellules mononucléées du sang périphérique (lymphocytes et monocytes) stressées à la chaleur, sécrètent des exosomes plus riches en Hsp70 que dans le cas contrôle (Lancaster et al, 2005). Or la présence de hsp70 dans le milieu extracellulaire de monocytes ou de cellules dendritiques stimule la production de divers facteurs de prolifération, comme les interleukines IL1 β , IL6, et IL12, et le TNF α . Les exosomes serviraient ici de messagers d'alerte, signalant au système immunitaire la présence d'un stress et permettant de mettre en route une réaction adaptée. De même, des cellules tumorales (lignée érythrocytaire K562) stressées par un traitement à l'IFN γ ou à la chaleur, sécrètent des exosomes riches en hsp72. Ces exosomes sont alors capables d'activer *in vitro* des cellules dendritiques naïves (Bausero et al, 2005).

▪ Régulation par p53

Lors d'un stress cellulaire, la protéine p53 intervient dans les mécanismes de régulation de ce stress. P53 est un facteur de transcription qui déclenche l'expression de nombreux gènes en réponse à divers stress cellulaires comme des dommages causés à l'ADN, ou une déprivation en nutriments. Les gènes cibles de p53 codent pour des protéines capables d'arrêter le cycle cellulaire, de réparer l'ADN ou de déclencher la mort cellulaire.

Une irradiation aux rayons γ de cellules tumorales provoque une augmentation de la production de p53 et une élévation drastique de la sécrétion d'exosomes par ces cellules. Les mêmes cellules p53 $-/-$ ne produisent pas d'exosomes, même lorsqu'elles sont irradiées.

P53 régule entre autre l'expression de TSAP6 (*tumour suppressor-activated pathway*), une protéine à 6 domaines trans-membranaires présente à la membrane des endosomes. Cette protéine interviendrait dans le métabolisme du fer dans les érythrocytes, mais aussi dans la sécrétion de certaines protéines comme TCTP/HRF (*translationally-controlled tumour protein* ou *Histamine releasing factor*). TCTP, une fois sécrétée, provoque la libération d'histamine par les polynucléaires et les mastocytes. Une étude a montré que TCTP était sécrété par la voie exosomale, et que la surexpression de TSAP6 augmente significativement cette sécrétion. De façon intéressante, TSAP6 est lui aussi retrouvé dans les exosomes (Amzallag et al, 2004). Une activation de p53 en cas de stress cellulaire augmenterait donc l'expression de TSAP6, qui en réponse augmente la sécrétion de TCTP dans les exosomes et permet une réponse au stress par la libération d'histamine par les cellules compétentes (Yu et al, 2006).

Récemment, il a été montré que p53 régule également des gènes codant pour des protéines de la voie endocytaire, comme *CAVI* (cavéolin-1) et *CHMP4C* (ESCRT III, voir p.28). La diminution de l'expression de CHMP4C par production de siRNA dans une lignée cellulaire (H460 et H1299, deux lignées de cancer pulmonaire) réduit la production d'exosomes, et la surexpression de CHMP4C dans une lignée p53 $-/-$ restaure la sécrétion d'exosomes. Il semblerait donc que CHMP4C joue un rôle dans la production des exosomes par ces cellules. La régulation de la sécrétion des exosomes par p53 en réponse au stress pourrait donc passer par cette voie (Yu et al, 2009).

d) Exosomes et virus

Les rétrovirus sont des virus à ARN qui infectent les vertébrés. Le plus connu des rétrovirus est sans doute le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), responsable du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Les virus interagissent avec des protéines présentes à la surface de la cellule cible puis fusionnent avec la membrane plasmique. L'ARN rétroviral se retrouve libéré dans le cytosol suite à la formation d'un pore entre le virus et la cellule hôte (fig. 8). L'ARN viral est rétro-transcrit en ADN grâce à la transcriptase inverse apportée par le virus lui-même, puis l'ADN viral s'insère dans le génome de la cellule hôte. Des ARN et des protéines du virus sont ensuite produits en utilisant la machinerie cellulaire, puis de nouveaux virions émergent à partir de la membrane plasmique.

De nombreuses publications ont montré le rôle des domaines *rafts* (voir p.26) dans l'infection des lymphocytes T par les rétrovirus. Par exemple, une déplétion en cholestérol inhibe la liaison du virus à la surface de sa cellule cible. Les *rafts* sembleraient lier la protéine virale gag (*group specific antigene*) et ainsi permettre l'entrée du virus dans la cellule hôte (Ono et al, 2007).

L'émergence des nouvelles particules virales semble également passer par les domaines *rafts* (Ono et al, 2001), présents soit dans la membrane plasmique, soit dans la membrane limitante de l'endosome. Dans les macrophages et les cellules dendritiques, il a été observé la formation de particules virales intracellulaires dans des compartiments endosomaux de manière similaire à la formation des ILV dans les MVB (Raposo et al, 2002) (fig. 8). Il est également intéressant de noter que les exosomes et les particules virales ont des caractéristiques similaires : même taille, et composition protéique de l'enveloppe virale et de la membrane exosomale relativement similaire (Nguyen et al, 2003).

Il semble aujourd'hui de plus en plus clair que les virus sont capables de détourner à leur profit la machinerie moléculaire permettant la formation des ILV. En particulier la protéine virale gag peut se fixer directement ou indirectement à certaines protéines des complexes ESCRT (voir p. 28) (Strack et al, 2003). En 2001, Martin-Serrano et al ont montré que l'assemblage et l'intégrité des protéines du complexe ESCRT I sont nécessaires à la formation des particules virales.

Ces observations ont conduit à l'hypothèse des « exosomes de Troie » : les virus pourraient utiliser la voie exosomale pour envahir l'organisme (Gould et al, 2003, et Pelchen-Matthews et al, 2004). Ce mécanisme permettrait au virus de rester camouflé à l'intérieur de la cellule avant d'émerger directement d'un compartiment intracellulaire, au lieu d'exposer ses protéines en surface et de risquer d'être détecté par le système immunitaire.

7. Passage du message exosomal dans la cellule « réceptrice »

La capacité des exosomes à activer ou réprimer une réponse immunitaire, à déclencher la prolifération cellulaire, et à véhiculer des signaux de stress, démontre que les exosomes permettent une communication intercellulaire:

1. par le déclenchement de cascades de signalisation dans les cellules réceptrices
2. par l'échange de protéines membranaires fonctionnelles et d'ARNm entre cellules.

La réception du « message exosomal » peut se faire selon plusieurs mécanismes (fig. 9):

- Les exosomes peuvent interagir en surface avec des récepteurs présents à la membrane de la cellule, et servir de ligand. Cette interaction de surface peut déclencher la transduction du signal à même d'activer la cellule réceptrice. Les exosomes liés en surface de la cellule réceptrice peuvent également participer à l'activation d'une autre cellule en apportant une partie des protéines nécessaires à cette activation.
- Les exosomes peuvent transférer des molécules cytosoliques effectrices, comme des kinases et des protéines G monomériques, soit directement, soit par l'intermédiaire des ARNm qui seront traduits dans la cellule réceptrice. Dans ce cas, il faut imaginer une fusion soit de l'exosome directement avec la membrane plasmique, soit une fusion avec la membrane limitante de l'endosome après son endocytose (*back fusion*).

a) Interaction en surface

Les études protéomiques effectuées sur les exosomes ont révélé qu'ils contiennent des protéines d'adhésion comme par exemple des intégrines ($\alpha 4\beta 1$ par exemple pour les exosomes de réticulocytes). Les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion comme VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*) avec lesquelles il a été montré que les exosomes peuvent interagir (Rieu et al, 2000).

En 2007, l'équipe de Segura et al s'est intéressée au mode d'interaction des exosomes avec les cellules dendritiques. Des DC sont fixées préalablement par du paraformaldéhyde, afin de prévenir tout mouvement membranaire. Elles ne sont alors pas capables d'activer les lymphocytes T lorsqu'on leur fournit un antigène. En revanche, si on les incube avec des exosomes porteurs de complexes CMH-antigène, elles deviennent en mesure d'activer les lymphocytes. Ces résultats montrent que les exosomes sont capables de participer à l'activation des lymphocytes T par les DC sans la nécessité d'une endocytose et d'un *processing* préalable. De plus, si les DC réceptrices utilisées proviennent d'une souris KO pour le gène de LFA-1, elles ne peuvent plus activer les cellules T par l'intermédiaire des exosomes, ce qui montre qu'une interaction de surface entre les exosomes et les DC est nécessaire à ce processus. La fixation des exosomes sur les DC semble donc passer par une interaction entre ICAM-1 (abondamment présent sur les exosomes de cellules dendritiques) et son récepteur LFA-1 sur les DC (Segura et al, 2007).

En 2007, Miyanishi et al ont montré qu'à la surface des lymphocytes T, les protéines Tim (*T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule*) pourraient être des récepteurs pour les exosomes. Les protéines Tim reconnaissent la phosphatidylsérine (PS) exposée dans la couche externe de la membrane plasmique des cellules apoptotiques, et permettent d'enclencher leur phagocytose. Mais cette étude a montré que les Tim1 et 4 sont capables d'interagir en surface avec la PS présente dans la membrane des exosomes, et suggère que ces protéines pourraient être impliquées dans l'interaction des exosomes en surface des lymphocytes, puis dans leur internalisation.

b) Internalisation des exosomes

Une étude réalisée en 2004 a montré que les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques en culture peuvent être endocytés par d'autres cellules dendritiques. Des exosomes de DC marqués avec le colorant lipidique fluorescent PKH67, sont incubés sur des cellules dendritiques et leur internalisation est suivie en microscopies confocale et électronique. Ils sont d'abord localisés au niveau des compartiments endosomaux précoces (colocalisation avec la transferrine) puis ils passent dans les compartiments plus tardifs (colocalisation avec Lamp1 après 20 minutes). *In vivo*, des exosomes fluorescents injectés à une souris se retrouvent 2h après dans les endosomes des macrophages du sang circulant, puis dans les cellules dendritiques spléniques 24 à 48h plus tard. Ces cellules dendritiques expriment ensuite à leur surface les antigènes apportés par les exosomes et les présentent aux lymphocytes T CD8⁺ en association avec les molécules du CMH synthétisés dans la cellule dendritique. Il y a donc un apprêtement des antigènes exosomaux dans les endosomes de la cellule réceptrice avant leur exposition en surface (Morelli et al, 2004).

La réexpression à la surface cellulaire de protéines apportées par les exosomes implique une fusion des exosomes endocytés avec la membrane limitante de l'endosome, puis une fusion des compartiments endosomaux avec la membrane plasmique. La fusion des exosomes avec la membrane de l'endosome est un processus appelé *back fusion*, dont l'existence est suggérée dans quelques travaux.

Les cellules présentatrices d'antigènes endocytent les antigènes, puis les protéolysent dans les endosomes multivésiculaires. Les peptides antigéniques sont ensuite placés sur les molécules du CMH II présentes dans la membrane des ILV. Lorsque les cellules dendritiques ne sont pas activées, 80% des CMH II sont présentes au niveau des ILV. Après activation des DC, on observe une diminution du pool de CMH II associé aux ILV à 50% (Kleijmeer et al en 2001). En 2001, Kleijmeer et al ont observé lors de l'activation des DC un allongement des endosomes multivésiculaires en compartiments tubulaires dépourvus d'ILV et enrichis en CMH II au niveau de la membrane limitante. Ces longs tubules, qui ont également été observés par Murk et al en 2002, migrent directement vers la membrane plasmique. Lors de l'activation des DC, il semble donc y avoir un signal qui déclenche la relocalisation des CMH II depuis les ILV vers la membrane limitante, puis vers la membrane plasmique (Chow et al, 2005). Cette hypothèse corrèle avec le fait que les cellules dendritiques sécrètent moins d'exosomes lorsqu'elles deviennent matures.

L'hypothèse de *back fusion* est également illustrée dans le cas de certains rétrovirus qui sont endocytés par certaines cellules eucaryotes. Les virus peuvent ensuite fusionner avec la membrane de l'endosome et libérer leur ARN dans le cytoplasme de la cellule. Cette *back fusion* du virus est contrôlée par certaines protéines impliquées dans la machinerie de formation des ILV dans les endosomes (Luyet et al, 2008, Le Blanc et al, 2005). Une implication de ces mêmes molécules dans la *back fusion* des exosomes endocytés peut donc être soupçonnée.

III. Mécanismes moléculaires à la base de la voie endocytaire

Les mécanismes de formation des ILV, et donc par extension, des exosomes, associent des processus de déformations et de fusions membranaires qui mettent en jeu de nombreux acteurs, à la fois protéiques et lipidiques.

1. Déformation membranaire

La voie endocytaire fait appel à des mécanismes de déformation membranaire multiples. La première étape est la formation de la vésicule d'endocytose, au cours de laquelle des molécules vont tirer la membrane vers l'intérieur, aboutissant au bourgeonnement de la vésicule dans du cytosol. Ensuite, au niveau des endosomes de tri, d'autres complexes moléculaires interviendront pour déformer la membrane dans le sens opposé, c'est-à-dire vers la lumière de l'endosome.

a) Vésicule d'endocytose

Les protéines de la membrane plasmique sont internalisées au niveau de vésicules d'endocytose (fig. 10). Le bourgeonnement de ces vésicules peut se faire au niveau de puits de clathrine (endocytose clathrine-dépendante) ou au niveau des cavéoles (endocytose clathrine-indépendante). Il existe également des voies clathrine et cavéoline – indépendantes qui ne seront pas détaillées ici.

- La clathrine se polymérise en trysskèle (assemblage à trois bras) pour former un maillage autour de la vésicule d'endocytose. Un trysskèle est composé de trois chaînes lourdes qui s'associent à trois chaînes légères ; les trysskèles s'assemblent ensuite entre eux par des interactions entre les chaînes lourdes. Les Epsines, les β -arrestines, et AP-2 (Adaptator

Protein 2) font partie du complexe protéique permettant l'arrimage des différents cargos (les protéines à endocyter) à la clathrine.

- Les cavéoles font partie des « radeaux lipidiques » (ou *rafts*, ou micro-domaines lipidiques), qui sont des zones de membrane d'un diamètre moyen de 40nm, particulièrement enrichies en sphingolipides et en cholestérol. Les *rafts* sont insolubles dans des détergents non-ioniques comme le Triton X-100 (on les appelle aussi DRM, pour *detergent resistant membranes*) et peuvent être purifiés par flottaison sur gradient de sucrose. Ils sont impliqués dans la compartimentalisation membranaire, car ils concentrent certains types de protéines tandis que d'autres en sont exclues. On y trouve en général des protéines à ancre GPI (Glycosyl-phosphatidyl-inositol) comme Thy-1 et la protéine du prion PrP (Nabi et al, 2003, Nichols, 2003). Sous la membrane plasmique au niveau des cavéoles, on trouve un enrichissement en cavéoline, protéine en épingle à cheveux de 21kDa qui a la capacité de lier le cholestérol. Les cavéoline-1 et 2 sont ubiquitaires, et s'assemblent en hétéro-oligomères autour de la vésicule. La flotilline (de type 1 et 2) est une protéine miristoylée et palmitoylée également enrichie au niveau des *rafts*, qui pourrait participer à la déformation membranaire en interagissant avec le cytosquelette d'actine, et jouerait également un rôle dans la régulation du taux de cavéoline-1 à la membrane en prévenant sa dégradation (Vassilieva et al, 2008). Lorsque les flotilline-1 et 2 couplées à la GFP sont surexprimées dans des cellules en culture, elles s'assemblent en « patches » à la surface cellulaire, et provoquent des invaginations de la membrane plasmique vers le cytosol (Frick et al, 2007).

La composition lipidique des exosomes rappelle celle des *rafts* de la membrane plasmique décrits précédemment. En 2003, de Gassart et al mettent en évidence dans les exosomes de 3 types cellulaires (réticulocytes, lignée érythrocytaire K562 et cellules Daudi (lignée de lymphocytes B), la présence de zones de membrane résistantes au Triton X-100 et flottant à basse densité sur gradient de sucrose, dans lesquelles ils isolent le ganglioside GM1, et des protéines associées aux *rafts* (flotilline-1, AchE). Ces résultats pourraient illustrer un rôle joué par les *rafts* dans la formation des exosomes.

La scission entre la vésicule d'endocytose et la membrane plasmique (endocytoses clathrine -dépendante et -indépendante) dépend de la dynamine, une GTPase qui se polymérise et forme une hélice autour du « cou » de la vésicule. L'hélice se resserre de manière GTP-dépendante et la vésicule d'endocytose est libérée dans le cytoplasme. Il existe également des mécanismes dynamine-indépendants impliquant d'autres GTPases (CDC42,

ARF6). Une fois formée, la vésicule d'endocytose fusionne avec un endosome précoce. Dans le cas des vésicules recouvertes de clathrine, cette fusion nécessite la perte préalable du manteau de clathrine.

b) Vésicules intra-luminales

Au niveau de l'endosome précoce, les protéines destinées à la dégradation sont regroupées dans des zones de membrane qui s'invaginent puis se détachent dans le lumen. La reconnaissance de ces protéines, leur tri et la formation des vésicules sont étroitement liés et font appel à de nombreuses interactions moléculaires.

▪ Complexes ESCRT

Les protéines destinées à la dégradation sont mono-ubiquitinylées (ajout d'une ubiquitine sur une lysine) ou multi-ubiquitinylées (ajout de mono-ubiquitines sur plusieurs lysines de la protéine cargo). Cette modification post-traductionnelle est assurée par les ubiquitine-ligases : par exemple, la fixation de l'EGF sur son récepteur (EGF-R) provoque l'ubiquitinylation de l'EGF-R par la E3 ligase Cbl. Il en est de même pour d'autres récepteurs aux facteurs de croissance comme le VEGF-R et FGF-R. En fonction du taux d'EGF dans le milieu extracellulaire, l'EGF-R est dirigé vers deux voies différentes : lorsqu'il y a peu d'EGF, l'EGF-R est endocyté par voie clathrine-dépendante, il est phosphorylé et recycle vers la membrane plasmique. Quand la quantité d'EGF extracellulaire augmente, il est dirigé vers les *rafts*, ubiquitinylé et envoyé vers la dégradation, ce qui permet un rétrocontrôle négatif du signal EGF (Acconcia et al, 2009).

Les parties cytosoliques ubiquitinylées des récepteurs qui dépassent à la surface de l'endosome catalysent la formation séquentielle de complexes protéiques appelés ESCRT (*endosomal sorting complexe required for transport*) qui vont déformer la membrane en vésicules vers la lumière de l'endosome et emprisonner les protéines à l'intérieur. L'internalisation des cargos dans ces vésicules permet d'une part d'isoler les récepteurs de leurs effecteurs cytosoliques, contribuant à stopper leur signalisation, et d'autre part à les mettre directement en contact avec les hydrolases acides après fusion des MVE avec les lysosomes. Les premières études sur le rôle joué par les ESCRT dans le système endosomal

ont été faites à partir de l'observation du phénotype des mutants de la voie de dégradation chez *S. Cerevisiae*. Les mutants des gènes ESCRT ont un phénotype commun dit « de classe E » caractérisé par une accumulation des cargos à la surface d'un endosome aberrant rempli de membranes et incapable de fusionner avec la vacuole, équivalent du lysosome chez la levure. Les protéines homologues chez les mammifères semblent agir de la même façon, ce qui montre que ces mécanismes sont très conservés entre la levure et les mammifères. Dans la littérature on trouve ainsi une nomenclature chez la levure (Vps de classe E, *vacuolar protein sorting*) et chez les eucaryotes supérieurs (CHMP, pour *Charged multivesicular body protein*), qui sont répertoriés dans le tableau 1.

Il existe trois gros complexes : ESCRT I, II et III. Le groupe Hrs/STAM est considéré aujourd'hui comme un complexe ESCRT 0, qui est chargé de reconnaître les ubiquitines sur les protéines et d'amorcer l'assemblage des complexes suivants. Le complexe I se forme à partir du recrutement de Tsg101 à la membrane de l'endosome par Hrs. Les complexes II et III s'assemblent ensuite par une cascade d'interactions protéiques (fig. 11). Le complexe ESCRT III recrute les désubiquitinyases qui clivent l'ubiquitine des protéines cargos avant leur envoi dans les vésicules intra-luminales. La dissociation du complexe ESCRT III nécessite à terme l'action de l'ATPase Vps4/SKD1, de la famille des AAA-ATPases (*ATPase associated with diverse cellular activities*), qui est recrutée à la membrane endosomale par son interaction avec CHMP3 et CHMP2 (Babst et al, 1998, Saksena et al, 2009).

Les CHMP (ESCRT III) sont impliqués dans des processus de déformation membranaire. *In vitro*, CHMP2A et CHMP3 s'assemblent en tubes hélicoïdaux capables d'interagir avec les membranes lipidiques par l'intermédiaire de leur extrémité basique (Muziol et al, 2006, Lata et al, 2008). CHMP4 est également capable de former des filaments incurvés sur les membranes (Hanson et al, 2008). Ces oligomères sont ensuite dissociés par l'ATPase Vps4. De plus, des protéines ESCRT III purifiées et mises en présence de liposomes induisent la formation de vésicules intra-luminales (Wollert et al, 2009). Plusieurs modèles d'assemblage des CHMP sont avancés aujourd'hui grâce à la biologie structurale. La formation des ILV se ferait par constriction d'un « lasso », ou d'une spirale, formée par les CHMP, ou par formation successive de tubes concentriques (Saksena et al, 2009, Nickerson et al, 2007). La déformation membranaire observée par les CHMP comporte une différence remarquable avec la dynamine, qui a un rôle analogue lors de la fission de la vésicule d'endocytose. Les CHMP permettraient la fission en agissant par l'intérieur du cou de la

vésicule en formation, tandis que la dynamine agit par l'extérieur en se resserrant autour de la membrane.

La formation préalable des complexes I et II serait nécessaire à la formation ultérieure des vésicules internes par les ESCRT III. La déplétion en Tsg101 (ESCRT I) par des siRNA dans les BHK diminue de 40% la formation des vésicules intraluminales (Falguières et al, 2008). Les ESCRT forment ainsi un engrenage qui lie la reconnaissance des protéines à dégrader à la formation de vésicules vers lesquelles elles sont entraînées.

Le PI(3)P présent dans la membrane des endosomes stabilise l'amarrage des complexes ESCRT, en interagissant avec eux par différents domaines de liaison (FYVE chez Vps27/Hrs du complexe ESCRT 0, ou GLUE, sur Vps36 du complexe ESCRT II). Il est le précurseur du PI(3,5)P₂ qui lie également des ESCRT (Vps24/CHMP3). Des cellules de mélanomes (MelJuso) mises en présence de wortmannine, un inhibiteur de la PI 3-kinase, qui produit le PI(3)P, présentent des MVE élargis contenant moins de vésicules intraluminales. Certaines vésicules restent accrochées à la membrane limitante de l'endosome, ce qui suggère que le métabolisme du PI(3)P joue un rôle dans la déformation membranaire et la scission de la vésicule dans la lumière de l'endosome, probablement par l'intermédiaire des ESCRT (Fernandez-Borja et al, 1999).

▪ Rôle des lipides dans la formation des ILV

La séparation des lipides en phase ordonnée (*rafts*) et désordonnée observée dans les membranes cellulaires peut être reproduite dans des liposomes géants (GUV). En faisant varier la composition lipidique des GUV, Bacia et al en 2005 ont montré que la présence de différents stérols modifie profondément la capacité des lipides à se séparer en phase ordonnée (*rafts*) et influence ainsi la courbure membranaire. Certaines compositions lipidiques induisent la vésiculation des GUV vers l'extérieur, et d'autres vers l'intérieur. Ces résultats montrent que les lipides à eux-seuls peuvent déformer les membranes.

Le LBPA présent dans les membranes endosomales se lie à Alix, une protéine également capable de fixer Tsg101 et CHMP4B des complexes ESCRT I et III. En 1998, une étude montre que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le LBPA dans la lignée cellulaire BHK désorganise la morphologie des endosomes multivésiculaires et altère le trafic du

récepteur à l'insuline (Kobayashi et al, 1998). De plus, la présence de LBPA sur des liposomes préparés avec une composition proche des endosomes tardifs, induit la formation de vésicules intra-luminales, à condition que le lumen des liposomes soit plus acide que l'extérieur (gradient 5.5-7) (Matsuo et al, 2004). Il est postulé que c'est la forme conique particulière du lipide qui permet la déformation de la bicouche lipidique en vésicule (fig. 12).

L'ajout d'Alix sur ces liposomes riches en LBPA inhibe fortement la génération des ILV. Par son interaction avec le LBPA, Alix pourrait désorganiser les membranes endosomales et ainsi altérer la formation des ILV. Dans leur étude sur les GUV, Bacia et al ont également montré que la toxine du choléra peut interagir avec le ganglioside GM1 et le déplacer vers les *rafts*. On peut imaginer qu'Alix, en interagissant avec le LBPA, puisse modifier son interaction avec les *rafts* et par extension, jouer sur la courbure membranaire.

In vivo, la déplétion d'Alix par des siRNA dans des cellules BHK réduit le nombre d'« endosomes multilamellaires » (endosomes tardifs), marqués par la protéine Lamp1 (*lysosomal associated membrane protein 1*) en immunofluorescence, et réduit également la présence de LBPA et de cholestérol sur les endosomes. En microscopie électronique, les endosomes apparaissent dépourvus de vésicules intra-luminales (Chevallier et al, 2008). La protéine Alix semble donc être impliquée dans les mécanismes de formation des ILV en régulant la présence à la fois du LBPA et du cholestérol dans la membrane des endosomes.

Il est intéressant de noter que la production d'exosomes n'est pas altérée par une déplétion en Alix dans les cellules BHK (Chatellard-Causse, non publié), alors même que cette déplétion réduit les endosomes multivésiculaires marqués par le LBPA. En considérant le fait que la présence de LBPA dans les exosomes n'est pas observée dans tous les cas, l'on peut imaginer l'existence de plusieurs mécanismes de formation des ILV aboutissant à l'existence de différents types de MVB, destinés soit à la dégradation, soit à l'exocytose.

Cette hypothèse a été avancée dans l'étude de White et al en 2006, qui montre que lors d'une stimulation de l'EGFR par son ligand, le récepteur est envoyé dans la voie de dégradation par des compartiments multivésiculaires différents de ceux qui contiennent le LBPA. La stimulation à l'EGF stimule la formation de nouveaux endosomes multivésiculaires, sous la dépendance de l'annexine-1, une protéine qui a la propriété de lier le calcium et les phospholipides, et qui est impliquée dans des mécanismes de fusion membranaire. L'annexine-1 pourrait ici permettre le rapprochement des deux portions de membrane qui doivent fusionner pour libérer la vésicule dans le lumen de l'endosome.

En 2008, Trajkovic et al ont examiné le trafic de la protéolipide protéine PLP dans la lignée d'oligodendrocytes Oli-neu. Cette lignée contient de larges endosomes multivésiculaires et produit des exosomes. Ils montrent que la déplétion en Tsg101 du complexe ESCRT I, ou d'Alix, ne réduit pas la sécrétion d'exosomes par cette lignée. En revanche, l'inhibition de la sphingomyélinase nSMase (*neutral sphingomyelinase*) provoque une réduction importante de la présence de PLP dans le lumen des endosomes, et diminue également la production d'exosomes. La sphingomyélinase est une enzyme qui clive la sphingomyéline en céramide. Les céramides sont des lipides qui ont une forme en cône, et dont la présence pourrait incurver la membrane et aboutir à la formation des ILV. Il a été montré que les céramides provoquent un regroupement des radeaux lipidiques en de larges plateformes qui rassemblent les protéines en clusters (Gulbins et al, 2003). L'équipe poursuit ses travaux *in vitro* en incubant la nSMase avec des GUV et observent effectivement la formation de microvésicules dans le lumen.

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence de plusieurs mécanismes de formation des ILV dans les endosomes. Une voie impliquant les complexes ESCRT, Alix et le LBPA, dont l'aboutissement pourrait être la dégradation dans les lysosomes, et une autre reliée au métabolisme des sphingolipides, dont le devenir serait la sécrétion dans le milieu extracellulaire pour donner les exosomes. Ceci est aujourd'hui à l'état d'hypothèse puisqu'aucun marqueur connu n'a pour l'instant permis de distinguer les MVB ESCRT-dépendants de ceux qui sont ESCRT-indépendants.

▪ **Rôle des tétraspanines dans la formation des ILV**

Les tétraspanines sont des protéines à 4 domaines transmembranaires particulièrement exprimées à la surface cellulaire et dans certains compartiments, dont les endosomes. Les tétraspanines peuvent servir de récepteurs de surface et intervenir dans l'adhérence cellulaire. Elles ont la capacité de se multimériser de façon homo ou hétérotypique, pour former des larges plateformes appelées TEM (*tetraspanin-enriched microdomain*) qui lient le cholestérol et l'actine (Delaguillaumie et al, 2004). Les TEM interviendraient dans le clustering de certains récepteurs à la membrane plasmique et influenceraient ainsi leur trafic (Hemler, 2003).

Les tétraspanines peuvent interagir avec les gangliosides comme le GM3 (Ono et al, 2001), et sont particulièrement enrichies dans les *rafts* présents dans la membrane des exosomes (Wubbolts et al, 2003). Les molécules de CMH II présentes dans les exosomes et les MVB sont concentrés dans ces domaines *rafts*-TEM, contrairement aux CMH II de la membrane plasmique qui se localisent dans des zones solubles aux détergents, ce qui suggère que la séquestration de récepteurs dans les ILV passerait par une localisation dans ces domaines riches en tétraspanines.

De plus, il a été montré que la surexpression d'une tétraspanine, la périphérine/rds (*retinal degeneration slow*) dans des réticulocytes provoque un aplatissement de certaines vésicules appelées microsomes, ce qui suggère que les tétraspanines ont un rôle dans la déformation membranaire (Wrigley et al, 2000).

Les tétraspanines, associés aux *rafts*, pourraient ainsi déformer les membranes de l'endosome et participer au tri des protéines vers la voie exosomale. Mais tout reste encore à découvrir dans ce domaine.

▪ **Influence des protéines cargos sur la formation des ILV**

La production des ILV dans les endosomes est reliée au tri des protéines à dégrader. Theos et al en 2006 se sont intéressés au trafic de la protéine Pmel17 dans des mélanocytes. Cette protéine transmembranaire est endocytée et envoyée dans les ILV par un mécanisme indépendant de l'ubiquitinylation. La protéine contient dans sa partie cytosolique une séquence qui est nécessaire et suffisante à son trafic dans les ILV. Les chercheurs remarquent en outre que les cellules qui surexpriment Pmel17 ont un nombre supérieur de MVB et d'ILV par endosome que les cellules contrôles. La protéine elle-même pourrait jouer un rôle dans la déformation membranaire à l'origine des ILV, indépendamment des ESCRT 0, I et II. En revanche, il n'est pas encore exclu qu'elle interagisse avec les ESCRT III.

Une étude de Fang et al sur la lignée Jurkat T a révélé que la simple oligomérisation des protéines dans une bicouche lipidique influence leur envoi dans les vésicules formées à partir de domaines endosomaux présents à la membrane plasmique (voir p.8). Pour cela, ils ont étudié le comportement de la protéine TyA de la levure *S. Cerevisiae* surexprimée dans les Jurkat T. Cette protéine soluble s'oligomérisse dans le cytosol, et sous cette forme elle n'est

pas sécrétée. En revanche, si un groupement acyl lui permettant de s'insérer dans les membranes est greffé à TyA, cette protéine s'oligomériser alors à la membrane plasmique. L'oligomérisation de TyA dans la membrane plasmique la dirige dans les vésicules qui bourgeonnent à partir de la membrane plasmique. Même si le bourgeonnement n'a pas lieu à la membrane des endosomes, cette étude a le mérite de suggérer que l'oligomérisation de la protéine cargo dans une bicouche lipidique peut jouer un rôle dans son tri vers les vésicules, et donc potentiellement dans la formation même de la vésicule.

De même, un mutant du TNFR (associé au syndrome de TRAPS : *TNFR-associated periodic syndrome*) qui n'est pas capable de s'oligomériser à la surface cellulaire, n'est plus sécrété par les exosomes de diverses lignées cellulaires, contrairement à la protéine sauvage (Lobito et al, 2006). Enfin, le cross-linking en surface du récepteur à la transferrine ou de l'acétylcholine estérase augmente leur sécrétion par les exosomes (Vidal et al, 1997).

2. Fusion membranaire

Dans la voie endocytaire, de multiples étapes de fusion membranaire sont mises en jeu, comme par exemple la fusion de la vésicule d'endocytose avec l'endosome précoce, ou encore la fusion des MVE avec les lysosomes et la membrane plasmique. Les MVE fusionnent également avec des vésicules en provenance de l'appareil de Golgi (voir fig. 1), et avec les autophagosomes. Ces derniers sont des compartiments qui capturent divers composants cellulaires (protéines, fragments de membrane, organelles). Leur fusion avec les lysosomes permet ensuite la dégradation de ce matériel. Peu d'éléments de l'étape de fusion entre MVE et membrane plasmique sont connus aujourd'hui, mais il est fort probable que les mécanismes moléculaires mis en jeu soient similaires à ceux des autres événements de fusion qui se produisent dans la voie endo-lysosomale.

La fusion membranaire nécessite d'abord une étape de rapprochement, puis d'amarrage des membranes de façon spécifique, avant l'étape de fusion à proprement parler. Ces étapes sont initiées et contrôlées par les protéines Vps de classe C et celles de la famille des Rab, tandis que la fusion membranaire à proprement parler est réalisée par les SNARE.

a) Reconnaissance et amarrage des membranes

▪ Les Vps de classe C

La machinerie Vps de classe E (*vacuolar protein sorting*), comme vu précédemment, forme les complexes ESCRT nécessaires à la formation des ILV dans les endosomes. Mais certaines études impliqueraient d'autres protéines de la même famille, les Vps de classe C, dans les mécanismes de fusion membranaire dans la voie endocytaire. Comme les Vps de classe E, ils ont été découverts à partir de mutants chez *S. Cerevisiae* qui n'avaient pas de vacuole/lysosome identifiable. Les Vps-C forment deux complexes, HOPS (*Homotypic fusion and vacuole protein sorting*) et CORVET (*class C core vacuole/endosome tethering*), qui seraient situés sur la face cytosolique des membranes et contrôleraient toutes les étapes, depuis la reconnaissance spécifique des compartiments jusqu'au recrutement et à l'activation de la machinerie de fusion membranaire (Nickerson et al, 2009, voir tableau 2).

Entre autres, la surexpression des protéines Vps18 et 39 augmente l'agglomération des endosomes tardifs et des lysosomes, tandis qu'au contraire, une déplétion en Vps18 disperse les compartiments. En 2009, Akbar et al montrent que la protéine Vps33A est nécessaire à la fusion des autophagosomes et des endosomes tardifs avec les lysosomes chez la drosophile. Les complexes HOPS auraient la capacité de s'assembler en oligomères capables d'amarrer à longue distance des compartiments de même type, et de courber les membranes.

Outre le rapprochement et l'amarrage des membranes endosomales, il a été montré que les complexes HOPS peuvent également interagir avec les protéines SNARE qui permettent la fusion membranaire (Nickerson et al, 2009).

▪ Les petites GTPases monomériques Rab

Les Rab (*Ras-related in brain*) sont des petites GTPases (Guanosyl tri-phosphatase) monomériques de 20 à 25kDa qui font partie de la super-famille des Ras (*Ras sarcoma*). Elles oscillent entre deux états, un état « on » lié au GTP (Guanosine tri-phosphate), et un état « off » après hydrolyse du GTP en GDP (Guanosine di-phosphate). Les Rab comptent une soixantaine de membres et sont présentes à la surface cytosolique des compartiments intracellulaires, où elles contrôlent le trafic membranaire. Chaque Rab est associée à un compartiment spécifique et permet son ciblage et sa fusion avec le bon compartiment accepteur. Certains membres de la famille des Rab sont des homologues des Vps-C chez la

levure, comme Rab5, présent aux endosomes précoces, et Rab7, dans les endosomes tardifs. Les Rab participeraient au recrutement des complexes nécessaires à l'amarrage des membranes sur des longues distances, à leur rapprochement, puis au recrutement de la machinerie de fusion SNARE.

🌱 Rab 5 et le recrutement d'une plateforme pour la fusion des endosomes précoces

La surexpression dans la lignée BHK d'un mutant de Rab5 (Rab5 Q79L) qui ne peut plus hydrolyser le GTP, et qui est donc constamment sous sa forme « on », génère des endosomes précoces plus larges. Cela suggère que la forme GTP de Rab5 permet la fusion homotypique des endosomes précoces (Stenmark et al, 1994). Au contraire, la surexpression d'un mutant ayant une forte affinité pour le GDP génère des endosomes précoces à l'aspect plus fragmenté. D'autre part, Rab5a interviendrait également dans la formation des vésicules d'endocytose et leur amarrage puis leur fusion avec les endosomes précoces (Stenmark et al, 2001).

Rab5 et le PI(3)P serviraient de site d'ancrage pour les protéines nécessaires au rapprochement et à la fusion des membranes. Il a en effet été montré que Rab5 peut interagir avec un facteur d'amarrage présent dans la membrane des endosomes précoces appelé EEA1 (*early endosome antigene 1*), qui interagit avec les SNARE (syntaxines 6, 7 et 13). La formation de ce complexe est nécessaire à la fusion des endosomes précoces entre eux (McBride et al, 1999). En 2009, Ohya et al publient leurs travaux réalisés sur des protéoliposomes. Ils montrent la nécessité de la présence concomitante des Rab et des SNARE dans la fusion de ces compartiments, et mettent en évidence la coordination des deux systèmes pour permettre la spécificité et l'efficacité de la fusion. Les Rab mettraient en place une plateforme d'effecteurs (Rabaptine 5, EEA1, rabénosyne 5, PI(3)P) qui recrute ensuite les SNARE, aboutissant à la fusion des membranes.

🌱 Conversion Rab5/Rab7 au niveau des endosomes multivésiculaires

Lors de la migration rétrograde des endosomes multivésiculaires se produit une maturation de l'endosome par une conversion dite « Rab5/Rab7 », qui lui donnerait la capacité de fusionner avec les compartiments plus tardifs. En 2005, Rink et al observent une perte progressive de l'expression de la protéine Rab5 à la surface de l'endosome lors de sa migration, et une apparition concomitante du signal Rab7. Rab5 est complètement absent des

vésicules intraluminales. Rab7 pourrait participer à la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes (Vanlandingham et al, 2009).

En 2005, Vonderheit et al décrivent l'endocytose du virus Semliki Forest (SFV) dans une lignée cellulaire (*Vero cells*). Ils montrent que Rab5 et Rab7 sont présents à la membrane des endosomes précoces et forment des « patches » à leur surface. Les domaines de membrane Rab7-positifs se séparent des endosomes précoces en englobant les particules virales, et migrent le long des microtubules jusqu'aux compartiments tardifs. Rab5 est quant à lui complètement absent de ces compartiments multivésiculaires qu'ils appellent ici ECVs (*endosomal carrier vesicles*).

🌱 Rab11 et fusion des endosomes multivésiculaires

Dans la lignée érythrocytaire K562, la fusion homotypique des endosomes multivésiculaires semble impliquer la protéine Rab11. Rab11 a été initialement décrite comme étant associée à la membrane du Golgi et aux vésicules de sécrétion, où elle jouerait un rôle dans le trafic des protéines et des membranes entre les voies endosomale et sécrétoire. Elle serait également impliquée dans le recyclage du récepteur à la transferrine (Ullrich et al, 1996). Or la surexpression de la forme sauvage de Rab11 ou de son dominant négatif Q70L délété de sa fonction GTPase, aboutit à la formation d'endosomes multivésiculaires géants, en présence d'une haute concentration intracellulaire de Ca^{2+} , ce qui suggère que Rab11 dans sa forme « on » permet la fusion des MVB entre eux. En présence d'un chélateur de calcium, les MVE apparaissent amarrées entre eux comme sur le point de fusionner (Savina et al, 2005). Ces résultats montrent que Rab11 intervient dans l'amarrage des MVE entre eux, et que c'est l'étape finale de fusion qui requière la présence de calcium.

Il se pourrait que Rab11 intervienne également dans la fusion des MVE avec la membrane plasmique. En effet, la surexpression de la forme sauvage de Rab11 augmente la quantité d'exosomes récoltés après 24h de culture, tandis que la surexpression du mutant Q70L diminue au contraire cette sécrétion (Savina et al, 2002).

b) Fusion des membranes par les SNARE

Les SNAREs (**SNAP** (*Soluble NSF attachment Protein*) **Receptors**) sont des protéines présentes au niveau des membranes cellulaires, qui s'assemblent pour permettre la fusion des

bicouches lipidiques. Il existe un set de SNARE pour chaque type de fusion membranaire. Les SNARE contiennent dans leur structure des hélices qui interagissent entre elles pour former des complexes *trans* à 4 hélices parallèles appelées SNAREpin, qui resserrent les membranes l'une contre l'autre, à l'image d'une fermeture éclair.

Les v-SNARE (v pour *vesicule*) sont également appelées R-SNARE car elles apportent une arginine qui se retrouve au cœur du complexe SNAREpin. Les t-SNARE (t pour *target*, associées à la membrane cible) sont également appelées Q-SNARE car elles apportent en général 3 glutamines (Qa Qb et Qc) qui forment des liaisons hydrogène avec l'arginine. L'intervention de la protéine NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*) permet ensuite le désassemblage des complexes SNARE et leur recyclage pour d'autres évènements de fusion.

Les SNARE ont été découvertes à partir de l'observation du blocage de la libération des neurotransmetteurs par les toxines clostridiales (toxines du tétanos et botuliques). Ces toxines ont pour cibles les protéines qui permettent la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (fig. 13). La toxine tétanique clive la v-SNARE synaptobrevine (VAMP2, *vesicule associated membrane protein 2*), qui interagit normalement avec les t-SNARE SNAP25 et syntaxine au niveau de la membrane plasmique. Ces dernières sont les cibles de la toxine botulique. La synaptotagmine est un senseur de calcium qui permet la formation du complexe VAMP2-syntaxin-SNAP25 et donc la libération des neurotransmetteurs lors d'une entrée de calcium induite par la dépolarisation membranaire à l'arrivée d'un potentiel d'action.

Divers complexes SNARE, formés de partenaires différents, sont impliqués dans les évènements de fusion qui se produisent entre compartiments intracellulaires, ou entre les compartiments et la membrane plasmique.

- **Fusion des endosomes avec les lysosomes**

Lors de la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes, l'interaction entre la t-SNARE Syntaxine 7 et la v-SNARE Vamp8 semble nécessaire (Mullock et al, 2000). Le blocage de leur interaction par une compétition avec des anticorps inhibiteurs réduit fortement la fusion endosomes tardifs – lysosomes. Vamp8 est également appelé endobrevine, elle est

située sur les endosomes et permettrait également la fusion homotypique entre endosomes précoces, et entre endosomes tardifs (Antonin et al, 2000).

La protéine Ti-Vamp (*tetanus toxin-insensitive Vamp*) aussi appelée Vamp7, peut de son côté interagir avec la syntaxine 7 et la syntaxine 8 pour permettre également la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes.

Il est possible ici que le calcium contenu dans les compartiments endosomaux intervienne dans leur propre fusion. Des expériences menées par Pryor et al en 2000 ont montré qu'*in vitro*, la chélation du calcium à l'intérieur de compartiments endosomaux purifiés à partir d'hépatocytes de rat, inhibe la fusion entre endosomes tardifs et lysosomes.

- **Fusion des lysosomes avec la membrane plasmique**

La capacité de fusion des lysosomes avec la membrane plasmique a été montrée dans de nombreux types cellulaires, comme les fibroblastes (Martinez et al, 2000), les neurones (Arantes et al, 2006) ou les astrocytes en culture (Li et al, 2008). Une des fonctions de cette fusion pourrait être de réparer les déchirements de la membrane plasmique, ou de contribuer à l'apport de membrane nécessaire lors de la pousse neuritique. La fusion des lysosomes avec la membrane plasmique requière la formation d'un complexe entre la v-SNARE Ti-Vamp/Vamp7, et les t-SNARE SNAP23 et syntaxine 4 (Rao et al, 2004). Ti-Vamp semble donc être impliquée à la fois dans la fusion des lysosomes avec les endosomes tardifs et aussi des lysosomes avec la membrane plasmique, en s'associant dans chaque cas avec des partenaires différents.

De façon générale, les études dans ce domaine montrent l'implication de la synaptotagmine VII dans la régulation de cette fusion, sous la dépendance du calcium. La calmoduline, une autre protéine qui lie le calcium et active de nombreuses voies enzymatiques, pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'exocytose des lysosomes. En effet, lors de la réaction acrosomiale du spermatozoïde, les lysosomes fusionnent avec la membrane plasmique, pour permettre de lyser la membrane pellucide de l'ovocyte. Or il existe une relocalisation de la Calmoduline dans l'acrosome lors du déclenchement de la réaction acrosomiale (Colas et al, 2009).

- **Lysosomes sécrétoires et granules de sécrétion**

Dans certaines cellules, il existe une classe particulière de lysosomes, appelés lysosomes sécrétoires, qui contiennent des protéines nouvellement synthétisées en provenance de l'appareil de Golgi. Ces lysosomes sécrétoires fusionnent avec la membrane plasmique de façon régulée. En fonction des cellules, ils sont appelés granules (dans les plaquettes, les mastocytes, les polynucléaires, les lymphocytes), ou mélanosomes (dans les mélanocytes). La fusion de ces compartiments avec la membrane plasmique permet la libération de diverses molécules potentiellement actives dans le milieu extracellulaire. Par exemple, dans la réaction allergique, les mastocytes libèrent l'histamine par la fusion de leurs granulations avec la membrane plasmique. Ce processus de fusion membranaire fait intervenir les SNARE SNAP23 (Guo et al, 1998), Vamp7 et la Syntaxin 3, qui sont localisées à la membrane des granules (Hibi et al, 2000).

Les mélanosomes sont des granules qui stockent la mélanine dans les mélanocytes. Sous certaines conditions, comme une exposition aux rayons ultraviolets, ils fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer la mélanine et la transférer aux kératinocytes adjacents. Dans les kératinocytes, la mélanine formera une couche de protection autour du noyau pour le protéger des rayons UV. Ce phénomène est responsable de l'assombrissement de la peau en cas d'exposition au soleil. Les SNARE impliquées dans la fusion des mélanosomes avec la membrane des mélanocytes ne sont pas encore connus avec certitude, mais en 2001, Scott et al ont détecté les protéines VAMP2, SNAP23 et SNAP25 sur des mélanosomes purifiés à partir de mélanocytes de souris, et suggèrent une interaction de ces protéines avec la syntaxine-4 au niveau de la membrane plasmique. La régulation de l'assemblage de ces complexes pourrait impliquer la protéine Rab27. Chez l'homme, des mutations de Rab27 provoquent une dépigmentation de la peau, avec une accumulation de la mélanine dans les mélanocytes (Syndrome de Griscelli), ce qui suggère un rôle de Rab27 dans la régulation de la libération de mélanine par les mélanocytes. De plus, Rab27 interviendrait également dans le transport des mélanosomes vers la membrane plasmique. En effet, Rab27 permet de façon indirecte une interaction du mélanosome avec la myosine et leur amarrage au réseau d'actine. Les patients présentent également des déficits immunitaires, ce qui suggère que Rab27 pourrait jouer le même rôle au niveau des granulations des cellules du système immunitaire (Izumi et al, 2003).

- **Endosomes de recyclage**

Lors du recyclage des protéines à la membrane plasmique, les endosomes de recyclage fusionnent avec la membrane plasmique et permettent ainsi la ré-expression des protéines en surface. Les endosomes de recyclage fusionnent avec la membrane plasmique par un mécanisme faisant certainement intervenir la v-SNARE VAMP3 (ou cellubrevine). En effet, le clivage de cette protéine par la toxine du tétanos inhibe une partie du recyclage du récepteur à la transferrine. Il reste cependant une proportion de ces récepteurs qui est recyclée par un mécanisme différent (Galli et al, 1994).

La t-SNARE syntaxin 13 est également présente au niveau des endosomes, en particulier les endosomes tubulo-vésiculaires et les endosomes de recyclage. La présence d'anticorps inhibiteurs anti-syntaxine 13 réduit le recyclage à la membrane plasmique du TfR, ce qui suggère que la syntaxine 13 intervient également dans la fusion des endosomes de recyclage avec la membrane plasmique (Prekeris et al, 1998). Ces assemblages de SNARE pourraient être sous le contrôle de la protéine Rab11, car cette protéine est présente dans les endosomes de recyclage et régule le recyclage d'un certain nombre de récepteurs, comme le récepteur muscarinique à l'acétylcholine M4 (Volpicelli et al, 2002) et le récepteur β 2-adrénérgique (Parent et al, 2009).

Deuxième partie : La voie endocytaire dans les neurones

I. Description

Les neurones sont des cellules spécialisées et très compartimentalisées. Ils se composent d'un corps cellulaire, d'où partent les dendrites et l'axone. Les dendrites reçoivent les messages nerveux au niveau des synapses, et les propagent jusqu'au corps cellulaire. C'est au niveau du cône d'émergence de l'axone que s'effectuera la sommation des messages nerveux excitateurs (PPSE : potentiel post-synaptique excitateur) et inhibiteurs (PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur) reçus par le neurone. Si la somme atteint le potentiel seuil d'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants, les potentiels d'action sont émis et se propagent le long de l'axone. A l'arrivée des potentiels d'action dans les boutons pré-

synaptiques, les canaux calciques voltages-dépendants s'ouvrent, laissant entrer le Ca^{2+} et activant la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique.

Dans les cellules polarisées comme les neurones, les compartiments endosomaux ne sont pas répartis uniformément dans le cytosol, car ces cellules interagissent différemment avec le milieu extracellulaire en fonction de leur surface axonale ou somato-dendritique.

- Les endosomes précoces ont une morphologie tubulo-vésiculaire et sont situés dans les dendrites et les terminaisons présynaptiques. Ces compartiments peuvent avoir un diamètre allant de 50nm à quelques micromètres. On peut trouver des endosomes précoces dans le corps cellulaire, mais aucune structure de ce type n'est observée dans les axones.
- Les endosomes de recyclage sont présents essentiellement dans les dendrites.
- Les endosomes multivésiculaires sont situés le long des dendrites, leur diamètre est de 300 à 500nm (Cooney et al, 2002). Quelques MVE peuvent être présents le long de l'axone, en provenance du corps cellulaire ou des terminaisons pré-synaptiques. Ils sont transportés le long des microtubules neuritiques.
- Enfin, les endosomes tardifs et les lysosomes sont essentiellement concentrés dans le corps cellulaire autour de l'appareil de Golgi, et dans le segment proximal des dendrites (Parton et al, 1992, Park et al, 2007).

II. Endocytose des récepteurs au glutamate et plasticité synaptique

1. Description des récepteurs au glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus répandu dans le système nerveux central (SNC). Il est également le précurseur du GABA (acide γ -aminobutyrique), qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC. Le glutamate intervient dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, au niveau de l'hippocampe et du cortex.

Il possède deux types de récepteurs :

- les récepteurs ionotropiques, qui sont des récepteurs-canaux qui s'ouvrent après la fixation du glutamate. L'ouverture des récepteurs induit une dépolarisation (PPSE) dans la membrane post-synaptique, qui peut se propager jusqu'au corps cellulaire.
- les récepteurs métabotropiques, mGluR, qui transduisent le signal à l'intérieur du neurone par l'intermédiaire des protéines G auxquelles ils sont couplés.

Il existe trois types de récepteurs ionotropiques au glutamate : AMPA, NMDA et kaïnate. L'AMPA et le NMDA sont des agonistes de synthèse du glutamate, et le kaïnate est un autre agoniste issu de l'algue rouge *Digenea Simplex*.

- les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) sont des hétéro- tétramères faits de l'assemblage de 4 sous-unités appelées GluR (GluR1 à 4). On trouve essentiellement dans les neurones des récepteurs composés de GluR2 associés à GluR1 ou GluR3. Lorsque le glutamate se fixe aux GluR, le canal s'ouvre et laisse passer des ions Na^+ et K^+ . La présence de la sous-unité GluR2 rend les récepteurs imperméables au Ca^{2+} , et au contraire, des récepteurs AMPA qui en sont dépourvus peuvent laisser entrer du Ca^{2+} dans la cellule (Wang et al, 2002).
- Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-Aspartate) sont des tétramères formés de deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2 (NR2A à D, dont l'expression évolue au cours du développement). Les NMDAR sont perméables au Ca^{2+} , Na^+ et K^+ . Le canal est bloqué par un ion Mg^{2+} qui est éjecté lorsque la membrane est dépolarisée, permettant ainsi le passage des ions à travers le canal. L'ouverture optimale du canal nécessite également la fixation d'un autre agoniste de ces récepteurs, la glycine.
- les récepteurs de type kaïnate sont formés de 4 sous-unités (parmi GluR5, GluR6, GluR7, KA 1 et 2). Ils sont perméables aux ions Na^+ et K^+ , et sont présents en pré- et en post-synaptique.

Les récepteurs métabotropiques au Glutamate sont des homodimères à 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G hétéro-trimériques. Il en existe trois familles : mGluR1 et 5 sont couplés aux protéines Gq, qui induit l'activation de la phospholipase C. Cette famille est surtout présente en post-synaptique. Les deux autres familles contiennent les mGluR2 à 4 et 6 à 8, qui sont couplés aux protéines Gs, qui activent

l'adénylate cyclase. Ces deux familles sont plutôt en pré-synaptiques et agissent comme modulateurs de la libération du glutamate.

2. La plasticité de la synapse glutamatergique

Le nombre de récepteurs AMPA présents à la membrane post-synaptique détermine directement l'amplitude de la réponse à une libération de glutamate. Plus il y a de récepteurs AMPA en surface, plus l'amplitude de la dépolarisation (PPSE) sera importante. Les récepteurs AMPA peuvent ainsi être enlevés ou ajoutés à la membrane post-synaptique, donnant lieu à une plasticité importante de la synapse. L'apport et le retrait des AMPAR à la synapse peuvent se faire soit par diffusion latérale à partir de récepteurs déjà présents en surface depuis une zone extra-synaptique, soit par endocytose et exocytose des récepteurs.

a) Epine dendritique et densité post-synaptique

Dans les synapses glutamatergiques, la partie post-synaptique est le plus souvent située sur une épine, excroissance du tronc dendritique pouvant mesurer plus d'1µm de long (fig. 14). La taille, le nombre et la morphologie des épines sont très variables, et une même épine peut subir d'énormes changements au cours du temps. Une des théories de l'existence des épines serait la compartimentalisation des événements biochimiques qui se produisent à la synapse. En effet, le cou des épines forme un rétrécissement qui pourrait ralentir la diffusion des molécules, comme par exemple le Ca^{2+} , jusqu'au tronc dendritique, ou simplement confiner dans une zone restreinte tous les éléments nécessaires au fonctionnement de la partie post-synaptique.

Les remodelages membranaires qui se produisent durant la formation des épines, comme durant les modifications des épines matures, nécessitent un trafic endocyttaire important. Les endosomes tubulaires sont fréquemment observés à l'intérieur des épines, tandis que les endosomes multivésiculaires sont préférentiellement situés à leur base (Cooney et al, 2002). Il a été observé que sur la totalité des endosomes présents dans les dendrites, 70% sont situés à la base ou à l'intérieur des épines (Park et al, 2006, Kennedy et al, 2006). Il est intéressant de noter qu'un endosome est en moyenne présent pour 3 épines, suggérant l'idée de partage d'un « appareil endocyttaire » entre épines.

Les récepteurs AMPA sont ancrés dans la densité post-synaptique (PSD), un échafaudage sous-membranaire très complexe de protéines, qui apparaît comme une zone dense aux électrons en face du bouton pré-synaptique en microscopie électronique (fig. 14). Parmi les protéines de la PSD, se trouvent :

- PSD-95 (*post-synaptic density protein 95*), dont la surexpression dans des cultures neuronales augmente l'expression de surface des AMPAR (El-Husseini et al, 2000). PSD-95 semble jouer un rôle dans l'ancrage des récepteurs dans la densité post-synaptique en supprimant leur diffusion latérale et leur internalisation (Han et al, 2009).
- La stargazine, une tétraspanine de la famille des TARP (*transmembrane AMPA receptor regulatory protein*), interagit directement avec les AMPAR et régule leur maturation, leur trafic et leur stabilité à la synapse (Nicoll et al, 2006). La stargazine interagit également avec PSD-95 et pourrait faire le lien entre PSD-95 et les AMPAR. D'autre part, il semblerait que la stargazine augmente l'affinité des AMPAR pour le glutamate, augmentant par là même la réponse post-synaptique.
- PICK1 (*protein interacting with C kinase 1*), dont l'interaction avec la sous-unité GluR2 est indispensable à l'endocytose des AMPAR (Hanley et al, 2008).
- GRIP-1 (*glutamate receptor interacting protein-1*) interagit directement avec les AMPAR pour les stabiliser à la surface, et contrôle leur recyclage (Kulangara et al, 2006).

b) Endocytose des récepteurs au glutamate

▪ Endocytose dans les épines (fig. 15)

Il semblerait qu'il existe une zone d'endocytose (EZ) stable, adjacente à la densité post-synaptique, marquée par la clathrine et régulée par l'actine, dont l'établissement est indépendant de l'activité synaptique (Blanpied et al, 2002). Il existerait une sorte de pont protéique entre la PSD et la EZ, formé par les protéines Homer et dynamine-3. La présence de ces zones d'endocytose évoque l'idée d'un traitement local des modifications structurales des

épines (taille de l'épine, nombre de récepteurs à la synapse), plutôt qu'un transport depuis le corps cellulaire (Hirling, 2009).

Pour être endocytés, les récepteurs doivent se détacher de la PSD, puis migrer latéralement jusqu'à la zone d'endocytose. Une fois internalisés, les récepteurs AMPA sont triés dans les endosomes précoces, puis sont soit renvoyés à la membrane plasmique en passant par les endosomes de recyclage, soit dirigés vers la dégradation (fig. 15). Le recyclage des récepteurs à la surface nécessite la présence d'une EZ fonctionnelle, ce qui suggère un couplage local entre les mécanismes d'exocytose et d'endocytose. NEEP21 (*neuronal enriched endosomal protein of 21kDa*) est une protéine également présente à la synapse, qui permettrait le recyclage des AMPAR à la membrane plasmique, en interagissant avec GRIP-1 et la syntaxine 13. NEEP21 a été retrouvée dans les endosomes multivéculaires, en particulier dans les ILV (Utvik et al, 2009). Il a été observé que la sous-unité GluR2, une fois internalisée, est envoyée dans les endosomes Neep21-positifs (Steiner et al, 2002). D'autre part, l'endocytose des AMPAR est dépendante de la protéine Rab5 et de son interaction avec EEA-1 (Selak et al, 2006).

Outre une endocytose clathrine-dépendante, il a également été remarqué que les AMPAR (et les NMDAR) peuvent être localisés dans les domaines *rafts* (Hering et al, 2003). Lorsque l'on provoque chimiquement une déplétion en cholestérol et en sphingolipides dans des cultures de neurones d'hippocampe, le nombre des épines est significativement réduit, tandis que la taille des épines restantes augmente. Or cette même déplétion provoque une augmentation drastique de l'endocytose constitutive et régulée des AMPAR, suggérant que les AMPAR de surface interviennent dans le maintien des épines dendritiques.

La perte du site d'interaction à la cavéoline du récepteur métabotropique au glutamate mGluR1 le délocalise des radeaux lipidiques, et réduit parallèlement son internalisation constitutive. La présence de ce récepteur dans les *rafts* influence donc sensiblement son taux d'expression de surface et par conséquent jouerait directement un rôle dans la plasticité synaptique (Francesconi et al, 2009).

Les NMDAR possèdent des sites de liaison à la flotilline, et colocalisent avec cette protéine dans des cultures de neurones d'hippocampe (Swanwick et al, 2009). Or une simple déplétion des *rafts* dans des cultures neuronales les protège de la toxicité induite par une forte activation de ces récepteurs (excitotoxicité), ce qui suggère que le retrait des NMDAR des

radeaux lipidiques provoque leur internalisation, ou qu'en fonction de leur localisation à la surface, les NMDAR n'ont pas les mêmes effets intracellulaires (Abulrob et al, 2005).

La composition lipidique de l'épine est ainsi susceptible de modifier considérablement la physiologie neuronale en régulant l'expression de surface des récepteurs. Les zones de membrane résistantes aux détergents concentrent certaines protéines d'ancrage, comme PSD-95 et GRIP, ce qui pourrait renforcer l'ancrage des récepteurs à la synapse, mais aussi permettre une stabilisation du réseau d'actine qui forme l'armature de l'épine.

L'exocytose des récepteurs peut, quant à elle, se produire directement dans l'épine, ou au niveau du tronc dendritique. L'insertion de nouveaux récepteurs dans la membrane des dendrites nécessite ensuite une diffusion latérale des récepteurs jusqu'aux sites synaptiques. Cette diffusion latérale des récepteurs en surface a été observée par l'équipe de Daniel Choquet à Bordeaux, par une technique de marquage de surface avec des anticorps couplés à des billes de latex suivies en video-microscopie. Les sous-unités GluR2 présentes à la surface montrent une grande mobilité avec des périodes de stabilité réversible correspondant aux passages dans les parties post-synaptiques où les récepteurs sont ancrés par les protéines de la PSD (Borgdorff et al, 2002).

▪ **Régulation de l'endocytose des GluR**

Dans les neurones corticaux en culture, le blocage de l'activité neuronale par la TTX (tétrodotoxine, un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendant) réduit l'endocytose des AMPAR. Au contraire, une activation des synapses glutamatergiques par blocage des récepteurs inhibiteurs GABAergiques avec la bicuculline, augmente l'endocytose et la réinsertion des AMPAR à la membrane plasmique. Cette modulation du trafic endocytose-recyclage des AMPAR par l'activité synaptique dépend de l'activation des récepteurs NMDA, et du Ca^{2+} intracellulaire (Ehlers, 2000, Beattie et al, 2000). Le trafic endocyttaire des récepteurs AMPA à la synapse est donc étroitement lié à l'activité neuronale, et en particulier à l'activation des récepteurs NMDA.

En fonction d'une stimulation spécifique des récepteurs AMPA ou NMDA, le trafic des récepteurs AMPA est différent, et semble contrôlé par les sous-unités présentes dans le tétramère de l'AMPA. L'apport des récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique lors

d'une activation des récepteurs NMDA est contrôlé par la sous-unité GluR1 (Passafaro et al, 2001), tandis que le retrait des AMPAR lors d'une activation des récepteurs au glutamate est sous le contrôle de la sous-unité GluR2 (Lee et al, 2004).

Après l'application d'AMPA ou de NMDA dans les cultures de neurones d'hippocampe, les AMPAR sont internalisés et localisés dans les endosomes tubulovésiculaires présents le long des dendrites (Ehlers, 2000). Dans les deux minutes qui suivent la stimulation, la sous-unité GluR1 colocalise avec les protéines EEA-1 et Rab5. En présence d'AMPA, GluR1 est ensuite redirigé vers les endosomes tardifs (marqués par la protéine Lamp1), tandis qu'après une stimulation des récepteurs NMDA, GluR1 a plutôt tendance à être dirigé vers les endosomes de recyclage (colocalisation avec Rab11 et le TfR). En 30 minutes, les AMPAR sont renvoyés à la membrane plasmique après une brève stimulation au NMDA, tandis que 6h après la stimulation à l'AMPA, le signal intracellulaire des sous-unités GluR1 diminue significativement, évoquant une dégradation de la protéine.

c) Exemple de plasticité synaptique : potentialisation et dépression à long terme

La plasticité synaptique est particulièrement remarquable dans les événements de potentialisation et de dépression à long terme (LTP et LTD, *long term potentiation / depression*). Ces phénomènes pourraient être un des mécanismes moléculaires de la mémoire dans notre cerveau. Chez les mammifères, l'hippocampe est un lieu central de l'apprentissage. La découverte de la LTP, qui date de 1966, a été faite chez le lapin au niveau des synapses entre la voie perforante (VP) en provenance du cortex, et le gyrus denté de l'hippocampe. L'intensité des PPSE enregistrés au niveau du gyrus denté en réponse à une stimulation de la voie perforante peut être augmentée durablement si l'on réalise au préalable une stimulation à haute fréquence (stimulation tétanique, 100Hz) des fibres pré-synaptiques (LTP). Un tel phénomène a pu être observé des années plus tard dans d'autres parties du cerveau, comme le cortex, le cervelet et l'amygdale. A l'inverse, des stimulations répétées à basse fréquence (1Hz, voire moins), sont capables de diminuer les réponses post-synaptiques (LTD).

Un des modèles actuels repose sur un rôle central joué par les NMDAR dans la plasticité synaptique, de par leur capacité à ne s'ouvrir en présence de glutamate que lorsque la membrane post-synaptique est dépolarisée. Ils jouent donc un rôle de « détecteurs de

coïncidence » capable de réagir à une dépolarisation pré-synaptique (libération de glutamate) et post-synaptique (ouverture des canaux AMPA) simultanées. On sait que le flux de Ca^{2+} à travers les NMDAR déclenche des cascades de signalisation dont une des conséquences est une augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la surface post-synaptique. Cette augmentation du pool d'AMPA de surface permet d'accroître la dépolarisation post-synaptique pour une même libération de glutamate.

Lors d'une potentialisation à long terme, on observe non seulement une relocalisation des récepteurs au glutamate à la membrane post-synaptique, mais également une augmentation de la taille des épines dendritiques. Sur des neurones d'hippocampe en culture, une stimulation mimant les effets d'une LTP (LTP dite « chimique ») provoque une relocalisation des endosomes de recyclage depuis la base vers l'intérieur des épines. Le blocage de la fusion des endosomes de recyclage avec la membrane plasmique par surexpression d'un mutant inactif de la SNARE Syntaxine 13, inhibe la croissance de l'épine observée lors de l'induction de la potentialisation à long terme dans ces cultures (Park et al, 2006). L'apport de membrane nécessaire à la croissance des épines proviendrait donc de la fusion des endosomes de recyclage avec la membrane plasmique dépendant de la syntaxine 13. La fusion des endosomes de recyclage servirait non seulement à apporter des protéines susceptibles de modifier l'efficacité synaptique, mais aussi du matériel membranaire afin de modifier le volume de l'épine et de contrebalancer la perte de membrane due à l'endocytose.

A l'inverse, dans une LTD, l'expression de surface post-synaptique des GluR diminue, ce qui entraîne une chute de l'amplitude des PPSE. La LTD semble elle aussi dépendre du Ca^{2+} , et il existerait un couplage entre l'entrée de Ca^{2+} et l'internalisation des AMPAR (Hanley et al, 2005).

Troisième partie : Voie endocytaire et maladies neurodégénératives

Comme nous venons de le décrire, le système endo-lysosomal est à la base de la communication synaptique entre les neurones. Ceci peut sans doute expliquer pourquoi de nombreuses maladies neurodégénératives ont pour origine des dysfonctionnements de ce système. En outre, de plus en plus d'évidences montrent que la propagation de certaines protéines pathogènes à travers le système nerveux central pourrait également impliquer la voie endocytaire.

I. Encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST)

1. Découverte d'un nouvel agent infectieux

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles, comme la maladie de Creutzfeldt-jakob et de Kuru, sont provoquées par la dégénérescence de neurones dans le système nerveux central. Chez l'homme, la maladie de Creutzfeldt-jakob provoque une perte de l'équilibre et de la sensibilité, puis des démences à évolution rapide et fatale.

La plupart des cas d'encéphalopathie spongiforme sont sporadiques, mais on trouve également des transmissions héréditaires, et des contaminations suite à des greffes de tissus cérébraux provenant de cadavres ou de malades, de traitement avec une hormone de croissance, ou d'utilisation d'appareils chirurgicaux contaminés. Dans les années 80, une variante de la maladie de Creutzfeldt-jakob est apparue en Angleterre, l'encéphalopathie spongiforme bovine, liée à une consommation de farines animales issues des carcasses d'animaux. Cette forme d'encéphalopathie est transmissible à l'homme après consommation de viande contaminée, selon un mode encore inconnu.

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles sont des maladies à prions (*proteicaneous infectious particles*). Elles sont causées par la transmission d'un agent infectieux appelé PrPsc (*Prion protein scrapie*), une protéine qui a la capacité de se répandre dans l'organisme jusqu'au système nerveux central. La PrPsc est une forme anormalement repliée en feuillets β , d'une protéine ubiquitaire endogène appelée PrPc (*cellular prion protein*), qui comporte majoritairement des hélices α . La forme scrapie est résistante à un clivage par la protéinase K, et a la capacité de catalyser le changement conformationnel de la PrPc normale en PrPsc. La présence de la forme cellulaire est d'ailleurs indispensable à l'établissement de la maladie, comme le révèlent des études réalisées sur des souris KO pour son gène, auxquelles la forme scrapie a été injectée (Büeler et al, 1993). La découverte de cet agent infectieux dans les années 1980 par S.B. Prusiner, qui reçut le Prix Nobel de médecine en 1997, révéla pour la première fois l'existence d'un agent infectieux pour les mammifères, dénué d'acide nucléique.

Tous les mammifères expriment la PrPc, ce qui signifie qu'ils sont tous susceptibles de contracter une maladie du type encéphalopathie spongiforme. Chez l'homme, le gène *prnp* qui code pour la PrPc est situé sur le chromosome 20, et il est actuellement supposé que la présence chez certains individus d'un codon 129Met/Met engendrerait un plus grand risque de contracter la maladie que les autres variants (129Val/Met et 129Val/Val). Il est également possible que ces deux variants retardent simplement l'apparition des symptômes, mais les études épidémiologiques n'ont pas encore assez de recul pour l'affirmer. Des mutations dans ce gène sont responsables d'une forme héréditaire d'encéphalopathie spongiforme appelée insomnie fatale familiale, qui apparaît vers 50 ans et évolue en quelques mois vers le décès du patient. Le rôle physiologique de la protéine PrPc est encore mal compris. Bien qu'ubiquitaire, elle est principalement exprimée dans les neurones et semblerait permettre l'adhésion cellulaire et la pousse neuritique en interagissant avec la laminine, mais aussi intervenir dans le métabolisme du cuivre, l'apoptose et la transmission synaptique (Martins et al, 2001). Malgré cette pluripotence, les souris KO pour le gène *prnp* ont un développement normal et leur capacité d'apprentissage n'est pas altérée.

2. La PrP dans la voie endocytaire

a) La PrP dans les radeaux lipidiques

La PrPc est une glycoprotéine à ancre GPI qui est essentiellement située à la membrane plasmique dans les radeaux lipidiques. La forme endogène est principalement monomérique, tandis que la forme scrapie a tendance à se multimériser et à former des fibrilles amyloïdes extracellulaires (Caughey et al, 2006). Des études réalisées sur des souris transgéniques exprimant une protéine PrPc déletée de son ancre GPI montrent qu'elles sont résistantes à une infection par la protéine scrapie. Des études histologiques du cerveau de ces souris ont révélé la formation de plaques de type amyloïde à partir de la forme cellulaire sans GPI, mais qui de façon surprenante, ne sont pas toxiques pour les neurones (Chesebro et al, 2005). L'ancre GPI, et par extension la localisation de la protéine cellulaire dans les *rafts*, semble donc indispensable au changement conformationnel induit par la forme scrapie, et également interférer avec l'agrégation de la protéine dans le milieu extracellulaire. En revanche, la conformation scrapie en feuillets β paraît indispensable à la toxicité neuronale.

Une étude intéressante de Baron et al en 2002, qui travaillait sur des DRM purifiés à partir de la lignée N2a, a montré que dans ce système acellulaire, la conversion de la PrPc en PrPsc après addition du prion pathogène dans la solution, pouvait être augmentée en ajoutant un agent fusogénique (polyéthylène glycol). Ces travaux suggèrent que lors du premier contact infectieux entre la protéine scrapie exogène et la protéine endogène exprimée en surface des cellules, l'infection par la forme scrapie nécessite un échange de membrane, ce qui signifie que la PrPsc pourrait être associée à des vésicules lipidiques devant fusionner avec la membrane cellulaire pour permettre la conversion de la protéine endogène.

b) La PrP dans les endosomes

Dans les neurones, la protéine PrPc de surface est rapidement endocytée, semble-t-il principalement par les puits de clathrine. La protéine devrait donc sortir des radeaux lipidiques avant d'être endocytée (Sunyach et al, 2003). Sa présence dans les endosomes précoces et tardifs a été rapportée de nombreuses fois (Prado et al, 2004, Griffiths et al, 2007, Veith et al, 2009). Dans les neurones, la PrP colocalise dans les endosomes avec le récepteur à la transferrine et rab 5 (endosomes précoces), et la tétraspanine CD63 (endosomes tardifs).

Dans une lignée neurogliale exprimant la forme cellulaire, ou infectée par la forme scrapie, les deux formes sont endocytées et se retrouvent ensuite dans les vésicules intraluminales et à la surface des endosomes multivésiculaires, puis dans les exosomes. En outre, les exosomes provenant de cellules inoculées avec la PrPsc sont capables d'infecter des cellules saines, et provoquent la maladie s'ils sont injectés dans le cerveau de souris (Février et al, 2004). Des travaux réalisés par Alais et al en 2008 ont ensuite confirmé la présence de la protéine PrPsc dans les exosomes sécrétés par les N2a infectées. Ces résultats suggèrent très fortement que les exosomes soit un vecteur de la propagation du prion dans l'organisme.

Récemment, il a été montré qu'*in vivo*, le liquide céphalo-rachidien d'ovins contient des exosomes portant la protéine PrPc (Vella et al, 2008). Les exosomes sont donc un excellent candidat pour expliquer le passage *in vivo* de l'agent infectieux depuis la périphérie (muscle, sang, intestins) vers, et à travers, le système nerveux central.

II. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une dégénérescence des neurones des zones limbiques, dont l'hippocampe, qui se propage ensuite à d'autres structures cérébrales. Les patients présentent des troubles de la mémoire, puis de la cognition, de l'orientation, et du comportement. Cette maladie survient de façon sporadique à un âge avancé (l'âge moyen des patients est de 82 ans), mais il existe aussi des formes familiales précoces, d'origine génétique, qui peuvent apparaître chez le jeune adulte. Il existe aujourd'hui deux caractéristiques histologiques de la maladie : d'une part les neurofibrilles intracellulaires (*neurofibrillar tangles*, NFT), qui correspondent à l'accumulation sous forme de polymères insolubles d'une protéine du cytosquelette appelée Tau, dans le cytoplasme des neurones. D'autre part, les plaques amyloïdes formées d'agrégats extracellulaires d'un peptide appelé A β (ou peptide amyloïde).

1. Le peptide amyloïde et son précurseur l'APP

L'A β est un peptide de 40 à 42 acides aminés issu du double clivage d'une protéine appelée APP (*Amyloid precursor protein*). Le gène de l'APP humain est situé sur le chromosome 21. Dans le syndrome de Down (Trisomie 21), la présence d'une copie supplémentaire du gène de l'APP provoque l'apparition de la maladie d'Alzheimer chez le jeune adulte.

L'APP est une protéine à un domaine trans-membranaire, dont la longueur varie de 695 à 770 acides aminés en fonction du type cellulaire. Les souris KO pour le gène de l'APP sont viables mais présentent des déficiences cognitives, défauts de mémorisation et problèmes locomoteurs, qui suggèrent qu'*in vivo*, l'APP interviendrait dans la mise en place de certains circuits neuronaux, ou dans la physiologie synaptique (Senechal et al, 2008). L'APP possède des sites de clivage par des enzymes appelées sécrétases, de type α , β , et γ . Les protéines ADAM 9, 10, 17 (*A disintegrin and metalloproteinase domain*), MDC-9 et BACE2 sont des α -sécrétases. La β -sécrétase neuronale est la protéine BACE1 (*β -site APP cleaving enzyme 1*). Enfin, la γ -sécrétase est composée des présénillines 1 et 2, qui forment le cœur enzymatique capable de cliver l'APP dans sa partie transmembranaire, associées à la nicastrine, APH-1 et

PEN-2 (Thinakaran et al, 2008). Il existe deux voies de clivage de l'APP par les sécrétases (fig. 16) :

- la voie non – amyloïdogénique : l' α -sécrétase clive d'abord l'APP au niveau de la membrane plasmique, libérant dans le milieu extracellulaire le sAPP α (*secreted APP α*). La partie membranaire restante, appelée C83 car elle représente les 83 acides aminés C-terminaux de l'APP, est ensuite clivée dans sa partie membranaire par la γ -sécrétase, pour produire le peptide p3 et l'AICD (*APP intracellular domain*)
- la voie amyloïdogénique : la β -sécrétase clive l'APP, légèrement en amont du site de l' α -sécrétase, libérant un fragment soluble plus court, le sAPP β , et le fragment membranaire C99. C99 est ensuite clivé par la γ -sécrétase, pour donner l'A β , et l'AICD. La γ -sécrétase peut cliver à différents sites, donnant naissance à des peptides A β de 37 à 43 acides aminés. Les plus fréquents sont l'A β 40 et l'A β 42, ce dernier étant celui possédant la plus grande propension à former des fibrilles qui s'associent en plaques extracellulaires.

Le fragment soluble sAPP α jouerait un rôle de facteur de prolifération cellulaire, chez l'embryon aussi bien que chez l'adulte. Sa sécrétion est augmentée après stimulation des précurseurs neuronaux avec l'EGF (*epidermal growth factor*), ce qui sous-entend des mécanismes cellulaires reliant ces deux voies (Caillé et al, 2004). Le fragment AICD jouerait quant à lui un rôle de co-facteur d'activation de la transcription de certains gènes, dont le gène du récepteur à l'EGF (Zhang et al, 2007). Les deux voies existent a priori dans tous les types cellulaires. Les règles qui déterminent la prédominance d'une voie sur l'autre ne sont pas encore bien connues, bien que le type cellulaire et la présence de cholestérol semblent jouer un rôle. Par exemple, par rapport à d'autres cellules, les neurones expriment beaucoup de BACE1 (β -sécrétase), ce qui favorise la voie amyloïdogénique (Thinakaran et al, 2008). La voie non-amyloïdogénique se produirait principalement à la membrane plasmique, où se situe l' α -sécrétase, tandis que la voie amyloïdogénique est plutôt effectuée dans les compartiments intracellulaires, dont les endosomes.

Il existe à ce jour 25 mutations connues dans le gène de l'APP, dont 19 sont responsables de formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Elles sont essentiellement situées dans ou à proximité des sites de clivage par les sécrétases (fig. 17). Ces mutations altèrent le *processing* de l'APP, en générant soit une plus forte production de peptide

amyloïde, soit des fragments aberrants. Par exemple l'APP *swedish*, qui est un variant trouvé dans une famille suédoise atteinte par la maladie, porte la double mutation K670N M671L, dans le site de clivage par la β -sécrétase. Cette mutation induit une augmentation de la production d'A β 42 (Citron et al, 1992, Tienari et al, 1997). L'APP *London* est un autre variant, trouvé chez une famille anglaise, dont les mutations I716V V717I se situe dans le site de clivage par la γ -sécrétase. Il existe également une centaine de mutations connues dans les gènes qui codent pour les présénillines 1 et 2, qui augmentent la production d'A β et sont responsables d'une apparition précoce de la maladie d'Alzheimer.

2. Toxicité de l'A β

a) A β extracellulaire et dysfonctionnements synaptiques

Les monomères solubles d'A β ont tendance à s'oligomériser, puis à former des fibrilles, qui s'assemblent ensuite sous forme de plaques extracellulaires. La toxicité du peptide en fonction de ses différentes formes est longuement discutée dans la littérature. Il a été observé dans le cerveau humain la formation de plaques amyloïdes sans apparition des signes cliniques de la maladie d'Alzheimer, ce qui signifie que les plaques ne seraient pas directement responsables de la mort neuronale. En revanche, l'injection d'oligomères d'A β dans le cerveau de souris déclenche une importante dégénérescence des neurones autour de la zone injectée, et une détérioration de la LTP (Lambert et al, 1998).

Il est de plus en plus avancé aujourd'hui que l'A β , indépendamment des plaques, engendrerait des dysfonctionnements synaptiques qui expliqueraient les déficiences cognitives observées dans la pathologie. Une étude de Kamenetz et al en 2003 a révélé que l'activité neuronale augmente la production d'A β , et qu'en retour, l'A β diminue la transmission synaptique excitatrice. Or l'application d'oligomères d'A β sur des tranches d'hippocampe réduit également le nombre d'épines dendritiques et de synapses, ce qui pourrait expliquer la baisse de transmission synaptique excitatrice (Shankar et al, 2007). Une autre étude a montré que les monomères et oligomères solubles d'A β altèrent la potentialisation à long terme dans des cultures hippocampiques ainsi que l'apprentissage chez des souris (Selkoe et al, 2008). L'action de l'A β pourrait passer par les récepteurs NMDA, puisqu'une inhibition de ces récepteurs inhibe la perte d'épines en présence d'A β .

Les monomères d'A β provoquent une perte des récepteurs AMPA et NMDA de surface (Roselli et al, 2005, et Almeida et al, 2005). Étonnamment, il existe une spécificité de fixation de l'A β sur les synapses glutamatergiques par rapport aux synapses GABAergiques (Lacor et al, 2007). Ceci pourrait expliquer l'apparition des déficits cognitifs très tôt chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Récemment, l'hypothèse de l'existence d'un récepteur de l'A β sur les neurones a été avancée. Une étude a montré que la protéine PrP interagit avec l'A β 42 et que cette interaction inhibe la potentialisation à long terme sur des tranches d'hippocampe. D'autre part, des tranches d'hippocampe prélevées chez une souris KO pour le gène PrP n'ont pas de détérioration de la réponse synaptique en présence d'oligomères d'A β 42. La protéine PrP serait donc le médiateur par lequel l'A β 42 induit le dysfonctionnement des synapses et cette interaction pourrait intervenir dans les signes précoces de la maladie d'Alzheimer (Laurén et al, 2009).

Il a été avancé que l'APP lui-même serait un récepteur pour l'A β . En effet, des neurones issus d'une souris KO pour le gène de l'APP sont partiellement résistants à la toxicité induite par les oligomères d'A β . L'APP est donc impliqué dans la toxicité de l'A β , et sa position transmembranaire à la surface cellulaire laisse penser qu'il pourrait un rôle de récepteur (Lorenzo et al, 2000).

b) A β intracellulaire et dysfonctionnements de la voie endocyttaire

Outre son agglomération extracellulaire, l'A β est également observé à l'intérieur des neurones à des stades plus précoces de la maladie. Un des modèles d'étude de la maladie d'Alzheimer est une lignée de souris transgéniques exprimant l'APP *swedish*. Avant la formation des plaques extracellulaires, il a été observé que le peptide A β 42 est majoritairement présent à la surface des endosomes multivésiculaires (fig. 18a) au niveau des dendrites et du soma des neurones hippocampiques. Cette localisation de l'A β 42 dans les MVB est également retrouvée dans le cerveau de patients Alzheimer, et augmente avec l'âge dans le cerveau de patients sains (Takahashi et al, 2002). L'accumulation d'A β dans les endosomes multivésiculaires et tardifs précède le déclenchement des symptômes, ce qui laisse supposer que cette localisation intracellulaire, d'avantage que les plaques extracellulaires, est délétère pour les neurones, et pourrait corrélérer avec la perte des synapses observée au début de la maladie

Dans l'hippocampe de patients décédés à un stade précoce de la maladie, et chez les patients atteints du syndrome de Down n'ayant pas encore développé de démence, il a été observé la présence d'endosomes aberrants, plus large que les endosomes des cas contrôles (Cataldo et al, 2000). Une surexpression de Rab5 ou de Rab7 dans une lignée cellulaire augmente de la même façon la taille des endosomes précoces et accroît parallèlement la production d'A β (Grbovic et al, 2003, Yuyama et al, 2009). Cet élargissement des endosomes est également observé dans la maladie de Niemann-Pick, caractérisée par une accumulation intracellulaire de certains lipides (cholestérol dans le type C et sphingomyéline dans les types A et B), principalement dans les endosomes tardifs. Les patients atteints de cette maladie présentent des enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) et des fibrilles intracellulaires d'A β , ce qui laisse supposer que ce sont des dysfonctionnements de la voie endo-lysosomale qui sont à l'origine de la production et de l'accumulation de ces protéines dans les deux maladies (Nixon, 2004).

3. *Processing* de l'APP dans la voie endocytaire

L'APP est synthétisé dans le réticulum endoplasmique, où il est N-glycosylé. Ensuite il est transféré à l'appareil de Golgi, où sa maturation s'achèvera par une O-glycosylation et une sulfatation. Il est ensuite adressé à la membrane plasmique, où il subit un rapide turn-over (recyclage en 5 à 10 minutes). Une partie est également dirigée vers la dégradation (Selkoe et al, 1996).

La voie endocytaire joue un rôle majeur dans le *processing* de l'APP. On sait que la production d'amyloïde dépend de l'endocytose de son précurseur, via un mécanisme clathrine-dépendant (Koo et al, 1994, et Perez et al, 1999). Le complexe enzymatique de la γ -sécrétase est présent dans les domaines *rafts* enrichis en cholestérol et sphingolipides, au niveau de la membrane des endosomes (Vetrivel et al, 2004). Les fragments C-terminaux de l'APP (CTF, C99 et C83) ont été repérés dans les MVB, et l'on sait qu'ils sont sécrétés par la voie exosomale. Cette sécrétion est augmentée par la bafilomycine, qui bloque l'acidification des endosomes et le transport des protéines vers les lysosomes. Une inhibition de la γ -sécrétase augmente également la sécrétion des CTF dans les exosomes (Vingtdeux et al, 2006, Sharples et al, 2008). Des études ont montré que l'APP entier était aussi sécrété par des

neurones en culture, sous forme d'agrégats ou associé à des microparticules de 50 à 100nm (Barber et al, 1995).

Ces travaux montrent que le clivage de l'APP implique très étroitement le système endocytaire, et en particulier la voie de sécrétion exosomale. En 2006, Rajendran et al montrent que dans la lignée de neuroblastome N2a surexprimant l'APP swedish, l'A β est présent à l'intérieur des endosomes multivésiculaires (fig. 18b), et est associé aux exosomes sécrétés. Ils montrent également la présence d'Alix dans les plaques séniles chez un patient Alzheimer. L'année précédente, une étude avait révélé qu'un autre marqueur exosomal, la flotilline-1, était également présent dans les plaques amyloïdes des souris transgéniques (Kokubo et al, 2005).

Les mécanismes qui contrôlent la sécrétion d'un peptide composé de la moitié du domaine transmembranaire de son précurseur, puis son agrégation en oligomères et en plaques sont encore mal compris. En 2008, une étude a montré que la sécrétion du lipide GM1 par voie exosomale déclenche la formation d'oligomères d'A β . L'amyloïde a la capacité de se lier au ganglioside GM1, et une inhibition de la liaison A β -GM1 empêche la formation des fibrilles d'amyloïde (Yuyama et al, 2008). Les exosomes auraient donc potentiellement un rôle à jouer à la fois dans la sécrétion du peptide A β , et dans son oligomérisation.

D'autre part, il a été montré que la sous-unité ADAM10 de l' α -sécrétase est sécrétée dans les exosomes, où elle clive un autre substrat, la protéine transmembranaire d'adhésion neuronale L1-CAM (Stoeck et al, 2006). En 2008, Sharples et al ont montré que la protéine BACE (β -sécrétase) et les présénillines 1 et 2 (γ -sécrétase) sont présentes dans les exosomes sécrétés par une lignée de cellules (CHO) qui surexpriment l'APP sauvage. Compte-tenu de la présence des CTF dans les exosomes, il est possible qu'une synthèse d'A β se produise également dans les exosomes.

Ainsi, le peptide A β pourrait être sécrété sous forme soluble puis s'assembler en fibrilles insolubles, éventuellement sous l'effet du ganglioside GM1 enrichi dans les exosomes, mais aussi être sécrété ou produit dans la voie exosomale. C'est pourquoi il est d'une importance capitale de comprendre les mécanismes qui contrôlent la sécrétion exosomale par les neurones. Dans le cas où les exosomes permettraient le passage interneuronal de matériel, à l'image des mécanismes observés dans les cellules du système immunitaire, ils pourraient aussi expliquer comment la pathologie, qui se développe à partir

des zones limbiques, se propage d'abord aux zones para-limbiques puis aux aires corticales auxquelles elles sont fonctionnellement associées (Buckner et al, 2009, Seeley et al, 2009).

III. Voie endocyttaire et propagation de la toxine du Tétanos dans le système nerveux

1. La toxine du Tétanos (TeNT) et son mécanisme d'action

La toxine du tétanos est produite par la bactérie *Clostridium tetani*. Il s'agit d'une Zn²⁺-protéase de 150 kDa, qui est spécifique des neurones. Elle est formée par l'association par pont disulfure d'une grande sous-unité de 100kDa, responsable de la liaison spécifique aux neurones et de l'internalisation du complexe, et d'une petite sous-unité de 50kDa qui porte l'activité enzymatique. Cette enzyme a pour cible la synaptobrevine (ou VAMP2, de la famille des SNARE), qui intervient dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (Schiavo et al, 1992). Un contact avec la TeNT provoque une paralysie (tétanie) du corps par blocage de la libération du GABA (acide γ -amino-butirique) au niveau des interneurons qui contrôlent les motoneurons de la moelle épinière.

L'infection se produit en général après une blessure avec des objets contaminés. Après avoir passé la barrière cutanée, la toxine entre dans les motoneurons au niveau des jonctions neuromusculaires (fig. 19). Elle est internalisée puis transportée de façon rétrograde dans l'axone du neurone moteur. La toxine remonte ainsi jusqu'au système nerveux central où elle est transférée dans les interneurons de façon trans-synaptique selon un mécanisme encore inconnu. Ce n'est qu'une fois dans les interneurons que la toxine clive la synaptobrevine et inhibe la libération du GABA. Une autre toxine clostridiale, la toxine botulique (BoNT) produite par la bactérie *Clostridium Botulinum*, connaît le même mode de contamination et a également pour cible des SNARE impliquées dans l'exocytose des vésicules synaptiques. Mais contrairement à la TeNT, elle agit directement à la jonction neuromusculaire et inhibe la libération d'acétylcholine.

2. Utilisation de la TeNT pour repérer les circuits neuronaux

La spécificité de la TeNT pour les neurones et son intéressante propension au passage trans-synaptique rétrograde se sont révélées utiles pour tracer des circuits neuronaux dans le

cerveau. La chaîne lourde de la TeNT est composée de deux sous-domaines : la partie N-terminale permet l'entrée de la protéase (chaîne légère) dans le cytoplasme, tandis que la partie C-terminale est responsable de l'interaction de la toxine avec les récepteurs de surface. Cette partie C-terminale (TTC : *tetanus toxin C-terminal fragment*), couplée à la GFP (*Green fluorescent protein*), est un formidable outil pour suivre le trajet des neurones connectés synaptiquement entre eux. Injectée à des souris au niveau de la langue, la protéine est détectée 12h après le long du nerf moteur hypoglosse, puis 24 à 48h plus tard dans de nombreux noyaux du système nerveux central (Coen et al, 1996).

3. Mécanismes d'internalisation de la toxine dans les neurones

a) Les récepteurs de surface

Injectée *in vivo* à des souris en périphérie, la GFP-TTC forme des clusters sur la membrane pré-synaptique des jonctions neuromusculaires, au niveau de puits de clathrine, et elle semble également localisée au niveau des *rafts* (Roux et al, 2005).

Un certain nombre d'évidences relie la fixation de la toxine à la surface des neurones avec les *rafts*. Le clivage des protéines à ancre GPI de surface par la phospholipase C prévient les neurones contre la toxicité de la TeNT (Munro et al, 2001), tout comme une déplétion en cholestérol (Herreros et al, 2001). Il a été montré que la chaîne lourde de la TeNT possède deux sites de liaison à des polysialogangliosides (Shapiro et al, 1997, Rummel et al, 2003). La toxine interagirait d'abord avec un oligosaccharide lié à la membrane via un ganglioside (GD1b et GT1b), puis un cluster de ces récepteurs se formerait, ayant pour conséquence de renforcer l'interaction et de la rendre irréversible. La toxine peut également se lier via sa chaîne lourde à la protéine Thy-1, une protéine neuronale à ancre GPI qui s'accumule dans les *rafts*. Mais Thy-1 n'est probablement pas l'unique récepteur de la toxine puisque des souris KO pour son gène restent sensibles à la TeNT.

Une fois la toxine fixée sur la membrane du neurone, l'oligomérisation des récepteurs (APR pour *Arrays of presynaptic receptors*) permet à la toxine d'être endocytée, puis transportée dans l'axone du neurone moteur dans le sens rétrograde. Il a été montré que l'endocytose de la toxine tétanique dépend de la dynamine et de la clathrine dans les neurones moteurs. Cette voie d'endocytose serait indépendante de la voie de recyclage des neurotransmetteurs, d'après Deinhardt et al en 2006. Au contraire, la toxine botulique semble

internalisée par cette voie de recyclage, via son interaction avec la synaptotagmine I et II (Montecucco, 2004). La principale différence de séquence peptidique entre les deux toxines se situe dans la partie C-terminale, par laquelle se fait donc l'interaction des toxines avec la membrane plasmique. Cette différence pourrait expliquer qu'elles emploient des voies d'internalisation séparées, et par extension qu'elles ont des comportements distincts dans le neurone moteur.

b) Les compartiments de transport

▪ Transport de la toxine dans des compartiments endosomaux

Une étude de 1987 par Parton et al, montre que la toxine tétanique endocytée par des neurones de moelle épinière de souris se retrouve dans les endosomes précoces au bout de 15 minutes, puis dans les MVB en 30 minutes. En 2006, Deinhardt et al étudient le trajet de la protéine GFP-TTC dans les motoneurones. Après son internalisation, la GFP-TTC est localisée au bout de 15 minutes dans des compartiments Rab5-positifs, puis après 60 minutes elle se situe dans des compartiments marqués par Rab7 qui migrent dans l'axone. Ils constatent que la protéine Rab5 semble intervenir dans les étapes précoces du tri de la GFP-TTC, car la surexpression de son dominant négatif abolit son transfert dans les compartiments de transport sans affecter son internalisation. Rab7 permettrait quant à elle le transport axonal à proprement parler, puisqu'une surexpression de son dominant négatif provoque une stagnation de la GFP-TTC dans l'extrémité de l'axone.

▪ Moteurs moléculaires du transport axonal de la toxine dans les motoneurones

La mobilité des endosomes qui transportent la toxine dans l'axone semble assurée par plusieurs moteurs moléculaires. D'une part, la dynéine, qui ancre les compartiments de transport sur les microtubules, et d'autre part la myosine V, responsable de la mobilité le long du réseau de F-actine (Lalli et al, 2002 puis 2003). La présence concomitante des deux protéines est nécessaire au transport rétrograde des compartiments qui transportent la toxine, ce qui suggère une coopération entre les deux mécanismes.

▪ Importance du pH à l'intérieur des compartiments

Une étude ancienne de Boquet et al en 1982 a montré que des changements de pH induisent des modifications structurales de la toxine. A pH neutre, l'enzyme aurait une conformation qui lui donne un caractère plutôt hydrophile, tandis qu'à pH acide, la toxine opèrerait un changement de conformation lui donnant la capacité de former un canal transmembranaire. Ce canal pourrait permettre dans les interneurones le passage de la toxine à travers la membrane de l'endosome, et lui donner accès à la synaptobrevine II localisée dans le cytosol.

Au contraire, dans les motoneurones, les compartiments qui transportent la toxine ont un pH neutre et ne s'acidifient pas durant le trajet axonal (Bonhert et al, 2005). Une étude de Salinas et al en 2009, étudie le transport de l'adénovirus CAV-2 (*canine serotype 2 adenovirus*) dans les motoneurones. Ce virus neurotrope est endocyté et puis transporté dans des compartiments qui gardent un pH neutre tout au long du trajet jusqu'au corps cellulaire. Les chercheurs observent que la toxine du tétanos est transportée dans les mêmes compartiments que l'adénovirus, suggérant l'existence d'un mécanisme commun de transport axonal rétrograde entre ces éléments, par des endosomes particuliers dont le pH neutre semble permettre de les maintenir dans le lumen sans qu'ils aient accès au cytosol.

4. Passage trans-synaptique

Le passage de la toxine du tétanos entre les motoneurones et les interneurones dans la moelle épinière est encore obscur. Personne aujourd'hui ne sait par quel mécanisme la TeNT passe du neurone moteur post-synaptique à l'interneurone pré-synaptique. La présence de la toxine dans les MVB, sa colocalisation avec Rab7 et les *rafts*, nous ont conduits à l'hypothèse que la TeNT pourrait être sécrétée par les exosomes au niveau du neurone moteur, qui lui permettraient ensuite d'être transférée aux interneurones.

Quatrième partie : Objectifs de la thèse

Les études menées sur différents types cellulaires montrent que les exosomes sont une voie importante de communication intercellulaire. Ils permettent des échanges de protéines

membranaires de surface, mais aussi d'ARNm, entre des cellules de type identique ou différent, et la propagation de signaux d'activation via ces messagers.

Nous nous sommes d'abord demandé si les neurones sécrétaient des exosomes. La sécrétion d'exosomes par les neurones pourrait permettre une communication entre les cellules du système nerveux, voire une contribution interneuronale à l'expression de surface des récepteurs aux neurotransmetteurs, ce qui représenterait une voie totalement nouvelle de modulation de la transmission synaptique. De plus, les exosomes neuronaux pourraient permettre la sécrétion et la propagation de protéines pathologiques dans le système nerveux, comme le peptide A β et la PrPsc.

Mon travail de thèse a été consacré dans un premier temps à la découverte de la sécrétion d'exosomes par les neurones. En utilisant le modèle des neurones corticaux de rat en culture, nous avons décrit les caractéristiques morphologiques, densitométriques, et protéomiques des exosomes neuronaux.

Dans un deuxième temps, nous avons regardé si la sécrétion des exosomes pouvait être régulée par l'activité neuronale. Cette partie a nécessité la purification et la détection des exosomes sécrétés pendant des temps très courts par les neurones primaires, en fonction des différents agonistes ou antagonistes appliqués sur les cultures.

Nous avons également travaillé avec la toxine du tétanos entière, et la partie C-terminale de sa chaîne lourde couplée à la GFP (GFP-TTC). En incubant les neurones corticaux avec chaque protéine, nous avons d'abord cherché à les détecter dans les exosomes neuronaux. Le passage trans-synaptique de la toxine étant encore inexpliqué aujourd'hui, la démonstration de sa sécrétion par voie exosomale serait non seulement une avancée dans la compréhension des mécanismes d'action de la toxine, mais aussi la démonstration de l'existence d'un transfert de protéines entre neurones par la voie exosomale.

D'autre part, nous avons essayé de construire les outils nécessaires à la démonstration d'un passage éventuel d'exosomes entre neurones. Certaines protéines sécrétées par les exosomes ont été choisies et couplées à une protéine fluorescente, afin de tester en microscopie le passage inter-neuronal de la fluorescence sous différentes conditions.

Enfin, nous avons travaillé sur des lignées cellulaires qui surexpriment l'APP sauvage ou porteur de mutations, et détaillé la sécrétion des fragments de clivage ainsi que leur localisation dans les compartiments endosomaux.

I. Culture cellulaire

1. Culture primaire

a) Neurones corticaux

- Préparation des boîtes de culture :

Les boîtes de Pétri ont été préalablement recouvertes de poly-D-lysine (Sigma, 50µg/ml) dissoute dans du tampon Borate. Après une nuit d'incubation à 37°C avec la poly-D-lysine, les boîtes sont rincées à l'eau deux fois puis le milieu d'ensemencement est ajouté est placé à 37°C.

Tampon Borate :

0,31% Acide Borique
0,47% Disodium Tétraborate
dans H₂O, pH 8.5.

Milieu d'ensemencement :

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)
10% sérum de cheval (Gibco) décomplémenté

- Dissection

Une rate gestante de souche RIOPS/OFA est placée 2 minutes sous une cloche contenant de l'isoflurane, puis décapitée. Les embryons sont prélevés au 19^{ème} jour de vie embryonnaire (E19) et leur cerveau est ensuite extrait. Toute la dissection est réalisée dans du PBS Glucosé préchauffé à 37°C.

PBS Glucosé :

0,04% KCl, 0,006% KH₂PO₄, 0,8% NaCl, 0,0048% Na₂ HPO₄, 0,035% NaHCO₃, 0,1% D-Glucose, Hépès 10mM, 10µg/mL de streptomycine , 10U/mL de pénicilline , pH 7.4.

Sous une loupe binoculaire, l'hippocampe et les parties internes du cerveau sont retirés, le cortex est prélevé et placé dans du PBS Glucosé chaud. Les cortex sont incubés 15 minutes à 37°C dans de la trypsine 0,25% contenant de l'EDTA (0,038%), du sucrose 33mM, et de l'Hépès 15mM pH 7.3. On effectue ensuite deux rinçages au PBS Glucosé chaud, puis les cortex sont placés 2 minutes dans de l'inhibiteur de trypsine (0,2% (p/v) dans PBS Glucosé) contenant 750 U/ml de DNase (0,5X), à 37°C. Ensuite, la dissociation mécanique est réalisée dans du PBS Glucosé, en passant les cortex plusieurs fois dans un pointe à filtre

1ml, en effectuant doucement des allers et retours. La solution est ensuite passée à travers une passoire cellulaire (diamètre 70µm, BD Falcon). Les neurones vivants sont comptés sur une lame de Malassez avec 0,04% de bleu de Trypan, et semés à la densité de 10^5 neurones / cm^2 . Après deux heures, à 37°C, le D-MEM + 10% Sérum de cheval est remplacé par du Neurobasal complet.

Neurobasal complet :

Neurobasal (Gibco), 1% sodium pyruvate, Glutamine 2mM, 10µg/mL de streptomycine, 10U/mL de pénicilline, 2% B27 (Gibco)

A 4 jours de culture, 25% de Neurobasal complet additionné de cytosine β -D-arabinoside (AraC) 10µM final est ajouté. L'AraC permet d'empêcher la prolifération des cellules gliales dans les cultures primaires de neurones. Les neurones sont ainsi cultivés in vitro jusqu'à 15 jours, nourris régulièrement tous les 4 jours.

b) Neurones d'hippocampe

Les boîtes de pétri sont recouvertes de poly-D lysine de la même façon que pour les neurones corticaux, et les milieux d'ensemencement et de culture sont identiques. Les hippocampes sont prélevés, incubés 13 minutes dans la trypsine/EDTA-sucrose 33mM-Hépès 15mM. Après dissociation mécanique, les neurones vivants sont directement comptés et ensemencés à la densité de 13000 neurones/ cm^2 . Les neurones d'hippocampe sont nourris tous les 4 jours et cultivés dans le Neurobasal complet avec de l'AraC à 5 µM pendant 21 jours.

2. Lignées cellulaires

a) Baby Hamster Kidney (BHK)

Les BHK sont une lignée de cellules épithéliales cultivées dans du G-MEM (Glasgow MEM) complet, supplémenté de 5% Sérum de Veau Fœtal (SVF) décomplémenté. Sur des cellules arrivées à confluence dans une boîte de Pétri, deux rinçages au PBS sont effectués, puis les cellules sont trypsinisées (trypsine-EDTA 0,25%) pendant 2 minutes à 37°C. Pour transfecter les BHK le lendemain, les cellules sont réensemencées au 1/10 ème. Pour effectuer la maintenance des cellules, elles sont divisées au 1/20 ème.

G-MEM complet:

G-MEM, Tryptose Phosphate Broth 2,6g/L, Glutamine 2mM , 10µg/mL de streptomycine , 10U/mL de pénicilline.

3. Transfections**a) Transfection des lignées cellulaires au jetPEI (polyplus transfections)**

L'ADN et le jetPEI sont dilués séparément dans une solution de NaCl 150mM, puis mélangés (la solution de jetPEI dans la solution d'ADN), et incubés à température ambiante pendant 20 à 30 minutes. Les volumes et masses d'ADN, de JetPEI et de NaCl 150mM en fonction des tailles de boîtes de Pétri utilisées sont indiqués dans le tableau suivant.

	Volume NaCl 150mM (µl)	Volume de Jet PEI (µl)	Quantité d'ADN (µg)
Boîte 35mm	250	4	2
Boîte 60mm	500	6	4
Boîte 100mm	1000	12	6

Après incubation à température ambiante, on dépose goutte à goutte le mélange ADN-jetPEI sur les cellules que l'on replace ensuite dans l'incubateur.

b) Transfection des neurones avec AMAXA

Les neurones sont transfectés le jour de la dissection. Après comptage à la lame de Malassez, $4 \cdot 10^6$ cellules sont centrifugées à 700rpm pendant 5 minutes. Le culot de cellules est repris dans 100µl de la solution Nucleofector dans laquelle l'ADN a été mis préalablement. La solution neurones + Nucleofector + ADN est placée dans une cuvette à l'intérieur de l'appareil AMAXA. Après électroporation, les neurones sont repris dans un petit volume de milieu d'ensemencement (DMEM + sérum de cheval 10%), déposés goutte à goutte dans la boîte de culture, et placés dans l'incubateur. Pour les expériences de cotransfections, une population de neurones a été transfectée avec un ADN, une autre avec un deuxième ADN, séparément, puis les neurones ont été mélangés avant d'être ensemencés et cultivés ensemble.

Les observations de ces transfections ont été réalisées sur un microscope confocal (Leica LAS AF-TCS SPE) ou sur un microscope à fluorescence (AxioVert 200M, Zeiss).

II. Purification des exosomes

1. Centrifugations différentielles

La purification des exosomes est réalisée après différents temps de sécrétion :

- pour les neurones, les temps vont de 5 minutes à 3h, selon les stimulations.
- pour les lignées, les cellules sont placées une nuit dans leur milieu de culture sans sérum, puis le lendemain ce milieu est récolté pour purifier les exosomes.

Le milieu de culture est récolté, et placé à 4°C. Des inhibiteurs de protéases sont ajoutés (Protease inhibitor cocktail tablets Complete EDTA, Roche), puis le milieu est centrifugé une première fois à 2000g pendant 10 minutes pour éliminer les cellules mortes et les gros débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé une deuxième fois à 20 000g pendant 20 minutes, puis passé au filtre (Millex GV non stériles en PVDF 0,22µm, Millipore). Le surnageant est enfin centrifugé 50 minutes à 100 000g. Le culot de vésicules extracellulaires obtenu est soit directement récupéré dans du tampon Laemmli pour l'analyse immédiate en Western Blot, soit repris dans du sucrose 0,3M (dissout dans du tampon imidazole 3mM pH 7.4) pour un fractionnement sur gradient de sucrose.

Tampon Laemmli :

62,5mM Tris HCl pH6.8, 2% SDS, 10% Glycérol, 0,002% Bleu de Bromophénol, 5% β mercapto éthanol

2. Fractionnement des exosomes sur gradient de sucrose :

a) gradient continu

Un gradient continu de sucrose 0,3M vers 1,4M (dans imidazole 3mM pH 7.4) est coulé dans un tube Beckman SW41 (volume total du gradient : 10ml), et l'échantillon d'exosomes repris dans un volume (200µl) de sucrose 0,3M avec inhibiteur de protéase est déposé en surface. Le gradient est centrifugé pendant 18h à 100 000g. Des fractions de 1ml sont ensuite prélevées (10 fractions) et diluées dans 8ml d'imidazole 3mM pH7.4. Chaque fraction ainsi diluée est centrifugée à 100 000g pendant 1 heure. Le culot obtenu est repris dans du tampon Laemmli pour être ensuite analysé en Western Blot.

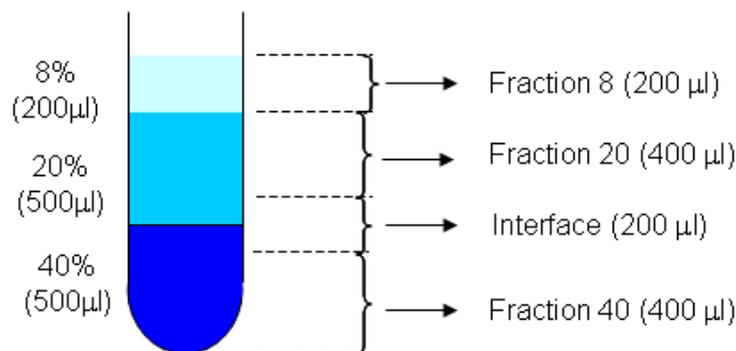
Solutions de sucrose (dans Imidazole 3mM pH 7.4):

0,3M : 8% (p/p)

1,4M : 60% (p/p)

b) Gradient discontinu de sucrose

Trois densités de sucrose sont déposées successivement. Les exosomes sont d'abord récoltés par centrifugation à 100 000g, puis le culot est repris dans du sucrose 8%, déposé à la surface de deux coussins de sucrose 20 et 40%. Le gradient est ensuite centrifugé 4h à 100 000g. Le dépôt (Fraction 8) est prélevé en premier, puis l'interface, la fraction 20 et enfin la fraction 40. Les protéines de chaque fraction sont ensuite précipitées dans un mélange chloroforme et méthanol, reprises dans du tampon Laemmli avant d'être analysées en Western-blot.



III. Lysats cellulaires

Les cellules sont lysées dans un solution de détergents RIPA. Les lysats sont mis dans des tubes Eppendorf et centrifugés à 16000g pendant 15 minutes pour culotter l'ADN.

RIPA :

1% NP-40

0,5% DOC (Déoxycholate)

0,1% SDS (Sodium Dodécyl Sulfate)

150mM NaCl

Volume de RIPA par boîte de Pétri :

100mm : 500µl

35mm : 150 µl

Pour les analyses semi-quantitatives en Western blot, chaque lysat est dilué 50 fois dans de l'eau puis 20µl de cette dilution additionnés de 5µl Tampon Laemmli 5X sont déposés sur le gel de polyacrylamide.

IV. Electrophorèse sur gel de Polyacrylamide en présence de SDS (SDS PAGE)

Les échantillons d'exosomes et de lysats dans le tampon Laemmli sont bouillis 5 minutes puis déposés sur un gel de polyacrylamide. La migration s'effectue entre 100 et 130V. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (0,45µm, Millipore) préalablement hydratée 1 minute dans de l'isopropanol puis dans le tampon de transfert. Le transfert s'effectue à 20V pendant 2h30, dans un appareil de transfert semi-sec (Trans-blot SD, Bio-Rad). La membrane de PVDF est ensuite lavée à l'eau puis saturée par une incubation dans du lait écrémé (Régilait) dilué à 5% (p/v) dans du TBS – Tween20, 0,1% (TBS-T) pendant 20 minutes (température ambiante) à une nuit (4°C) sous agitation.

Tampon de migration :	Tampon de transfert :	TBS (Tris buffer Saline) :
250mM Tris HCl	25mM Tris HCl	20mM Tris-HCl pH 7.6
192mM Glycine	192mM Glycine	0,8% NaCl (p/v)
0,1% SDS (p/v)	10% isopropanol	
	0,04% SDS (p/v)	

V. Western blot

L'anticorps primaire est dilué dans le lait 0,5% / TBS-T à la concentration indiquée dans le tableau suivant, et incubé une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, trois rinçages de 10 minutes à température ambiante sont effectués avec le TBS-T. L'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse raddish peroxydase, Jackson Immunoresearch Laboratories) est dilué dans le TBS-T et incubé sur la membrane pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite rincée 6 fois 5 minutes avec le TBS-T.

Le complexe protéine - anticorps primaire – anticorps secondaire couplé à la HRP est révélé avec le kit de détection ECL (*Enhance Chemiluminescent kit*, Millipore). Le signal luminescent est ensuite révélé sur film photographique (Hyperfilm-ECL, GE Healthcare).

Anticorps primaire	Source	Fournisseur	Référence produit	Concentration (ou à défaut dilution) d'utilisation	Poids moléculaire de la protéine (kDa)
Anti Alix	lapin	Covalab	pab0204	1/1500	91-93
Anti A β (clone 6E10)	souris	Chemicon	MAB1560	1 μ g/ml	A β : 4 C99 : 12 C83 : 9
Anti A β (clone 4E12)	souris	MBL	M066-3	1 μ g/ml	A β : 4 APP : 110
Anti APP	lapin	Chemicon International	AB5352	1/1000	APP : 110
Anti A β ₄₀ (FCA3340)	lapin	Calbiochem	171608	1/500	A β : 4 p3 : 3
Anti A β ₄₂ (FCA3542)	lapin	Calbiochem	171609	1/500	A β : 4 p3 : 3
Anti EEA1	lapin	abcam	Ab2900	1 μ g/ml	180
Anti Flotilline-1	souris	BD Transduction Lab	610820	250 ng/ml	48
Anti GLAST1	lapin	Zymed Laboratories	42-8100	1-3 μ g/ml	60
Anti GluR2	lapin	Millipore	AB-1768	0,5 μ g/ml	Env. 100
Anti GluR1	lapin	Calbiochem	PC246	5 μ g/ml	105-107
Anti GluR2/3	lapin	Chemicon	AB1506	0,1 μ g/ml	Env. 110
Anti NR1	souris	Pharmingen	60021A	1/1000	Env. 110
Anti Prp	souris (SAF32)	Donné par J. Gagnon (CHU, Grenoble)	/	0,4 μ g/ml	Env. 25
Anti Rab5	souris	Transduction Lab	R28720	1 μ g/ml	25
Anti Synaptobrevine 2/VAMP2	souris	Synaptic System	104211	0,01 à 0,1 μ g/ml	11-13 (ne reconnaît pas les fragments de clivage !)

Anti VAMP1,2,3	lapin	Synaptic System	104203	1 µg/ml	11 à 13, et fragments de clivage (??)
Anti Tetanus Toxin	lapin	abcam	ab53829	1mg/ml	Chaîne lourde :100 Chaîne légère :50
Anti Tsg101	souris	abcam	ab83	1 µg/ml	45
Anti GFP	souris	Covance	MMS-118R	0,4 µg/ml	Dépend de la protéine de fusion (GFP seule : 26kDa)
Anti L1 CAM	lapin	Donné par F. Rathjen (Max-Delbrück centrum)	/	1/1000	180-220

Tableau 1. Détail des différents anticorps primaires utilisés en western-blot

VI. Dot-blot pour la détection du peptide amyloïde

Les échantillons sont repris dans du tampon Laemmli et déposés sur une membrane de nitrocellulose 0,2µm. Trois lavages au TBS-T sont ensuite réalisés. Puis la membrane est bouillie 5 minutes dans du PBS, avant de réaliser le blocage puis l'immunodétection comme décrit dans la partie précédente. Les gammes de peptides synthétiques Aβ 40 et 42 (Sigma) ont été réalisées dans du PBS puis déposées sur la membrane de nitrocellulose. Le même volume des lysats de chaque condition est également déposé en parallèle.

VII. Semi-Quantification des signaux protéiques à partir des Western-blot

Les films ECL obtenus sont scannés (Duoscan f40, AGFA) en négatif (8 bits, 800dpi) et analysés sous Metamorph (Meta Imaging Series Version 7.5.6.0., MDS Analytical Technologies). Un seuillage inclusif est réalisé afin de délimiter les bandes de protéines à quantifier. L'analyse morphométrique est réglée pour donner la valeur totale de gris dans chaque bande. L'analyse morphométrique est réalisée pour les dépôts d'exosomes (culot

100000g) et pour les dépôts de lysats correspondants à chaque culot 100000g. Un rapport du signal (valeur de gris total exosomes / valeur de gris total lysat) est ensuite calculé, et les valeurs de ce rapport sont comparées en fonction des stimulations appliquées aux neurones. Chaque expérience est réalisée en triplicat lors de chaque culture. Ce sont les moyennes des rapports Exosomes/lysat par culture qui sont présentées dans chaque graphique, la valeur du contrôle ayant été ramenée à 1. Les expériences sont ensuite reproduites sur plusieurs cultures. A chaque culture, la valeur de la variation Contrôle/Stimulation est calculée, et une moyenne de ces variations est également présentée.

VIII. Microscopie électronique

Le microscope utilisé pour toutes les observations est un Microscope Electronique à Transmission (MET) Jeol JEM 1200EX.

1. Préparation des grilles

Les grilles (Gilder Grids Copper/paladium, Euromedex) sont lavées dans l'éthanol 100% puis placées sur un film de Formvar 2% (préparé dans du chloroforme). Après séchage, les grilles sont carbonées puis conservées à l'abri de la poussière.

2. Préparation des culots exosomaux

a) Etude morphologique des exosomes

Le culot exosomal obtenu à 100 000g pendant 50 minutes est repris dans du paraformaldéhyde 2% (dans du tampon phosphate (TP) 0,1M). Ce culot peut être conservé jusqu'à une nuit à 4°C.

Tampon Phosphate (TP, solution mère 0,5M, pH 7.4):

8,1 vol. de Na_2HPO_4 0,5M

1,9 vol. de NaH_2PO_4 0,5M

Une goutte de 5µl de l'échantillon est déposée sur une grille carbonée, et incubée à température ambiante pendant 20 minutes. Le surplus d'échantillon est retiré en passant la grille sur un papier buvard (Wattman). Les grilles sont ensuite rincées 2 fois au PBS, puis

fixées au PBS-Glutaraldéhyde 1% pendant 5 minutes à température ambiante. Après 7 rinçages de 2 minutes à l'eau distillée, les grilles sont incubées 5 minutes dans l'acétate d'uranyl 1% pH7, puis 10 minutes dans l'acétate d'uranyl 5% pH4 – méthylcellulose 2% (proportion 300 d'acétate d'uranyl pour 700 de méthylcellulose), sur la glace (les étapes avec l'acétate d'uranyl sont réalisées à l'obscurité). Le surplus de méthylcellulose est enlevé en passant les grilles sur buvard. Les grilles sont ensuite stockées à l'abri de la poussière.

PBS (Phosphate Buffer saline) :

pH 7.4

130mM NaCl

2,7mM KCl

5mM Na₂HPO₄

1,7mM KH₂PO₄

b) Immunogold sur culot d'exosomes

Après l'étape d'incubation avec l'échantillon, les grilles sont rincées au PBS et passées dans un mélange PBS-Glycine 50mM pendant 2 fois 3 minutes, puis dans une solution de PBS-BSA 1% pendant 10 minutes. L'anticorps primaire est dilué dans le PBS-BSA 1%, une heure à température ambiante. Après 3 lavages en PBS-BSA 0,1%, la protéine A couplée à une bille d'or (10nm) est diluée dans le PBS-BSA 1%, et incubée 30 minutes à température ambiante. Trois lavages au PBS sont ensuite réalisés (3 x 3 minutes), puis les grilles sont fixées au PBS-Glutaraldéhyde 1%, 5 minutes. Les grilles sont ensuite lavées 7 fois 2 minutes dans l'eau distillée et contrastées à l'acétate d'uranyl comme décrit dans la partie VII.2.a « Etude morphologique ».

3. Préparation des cultures primaires

a) Etude morphologique

Les neurones sont cultivés sur lamelle de verre ou sur lame 8 puits Lab Tek (Chamber slide system, Lak Tek) pendant 15 jours (cortex) et 21 jours (hippocampe). Après stimulations, les neurones sont fixés au tampon Cacodylate 0,1M (pH 7.2) – glutaraldéhyde 2,5% pendant 2 heures, puis lavés 3 fois dans du tampon Cacodylate 0,1M. Sur la glace, les neurones sont soumis à une deuxième étape de fixation pendant 1h dans du tampon cacodylate 0,1M pH 7.2 – tétroxyde d'osmium 1%. Après 3 rinçages à l'eau, la coloration est réalisée pendant 1 nuit à 4°C dans l'acétate d'uranyl 0,5% pH 4. Les échantillons sont ensuite

déshydratés dans des bains successifs d'éthanol 30% (10 min), 60% (10 min), 90% (10 min), et 100% (3 fois 10 min). La substitution est réalisée dans un mélange 50% résine Epoxy- 50% Ethanol pur, pendant 2h, puis l'imprégnation dans la résine pure pendant à nouveau 2h. Les échantillons sont enfin mis à polymériser pendant 2 jours à 60°C. Des coupes ultrafines de 70nm sont ensuite réalisées avec un microtome (Reichert Ultracut S, Leica). Les coupes sont placées sur grille et la coloration est faite par incubation pendant 10 minutes avec l'acétate d'uranyl 5% pH 4, à l'obscurité, puis avec le citrate de plomb 0,4% (NaOH 0,1N) pendant 5 minutes. Les coupes sont ensuite lavées à l'eau puis conservées à l'abri de la poussière.

b) Immunogold sur culture primaire

Les neurones cultivés sur lamelle de verre ou lame Lab Tek sont stimulés (15 jours de culture in vitro (DIV days in vitro) pour les neurones corticaux, 21 DIV pour les neurones d'hippocampe) puis fixés au tampon phosphate - PFA 2% - glutaraldéhyde 0,2%, pendant 2 heures à température ambiante. Après 3 lavages en PBS- Glycine 50mM et un blocage en PBS-BSA 1% 20 minutes, l'anticorps primaire est incubé 1h dans PBS-BSA 1% sur les cellules. Après 3 lavages en PBS-BSA 1%, la protéine A couplée à la bille d'or (15nm) est incubée sur les cellules pendant 15 min. Enfin, les cellules sont lavées au PBS puis fixées à 4°C dans du PBS-Glutaraldéhyde 1%, sur la nuit. Le lendemain, le protocole d'inclusion dans la résine Epoxy, puis les étapes de coupe et de coloration sont appliquées comme décrites précédemment (VII.3.a, « Etude morphologique sur culture primaire »).

c) Cryo-électromicroscopie sur neurones en culture

Les neurones corticaux à 15 DIV sont lavés au PBS, puis fixés pendant 2h dans le TP 0,1M - PFA 2% - Glutaraldéhyde 0,2%. Après 2 rinçages au TP 0,1M, les cellules sont lavées au TP 0,1M – Glycine 50mM puis détachées (cell scraper, XXX). Les cellules sont récupérées par une centrifugation à 1200rpm pendant 5 minutes. Le culot est repris dans la gélatine à 37°C, les cellules à nouveau centrifugées, puis placées sur la glace pendant 1h. Des cubes de gélatine sont ensuite découpés, et une étape de cryoprotection est réalisée par incubation 1 nuit sous agitation dans du TP 0,1M – sucrose 2,3M. Les cubes sont placés dans l'azote liquide, et coupés à - 115°C avec une épaisseur de 70nm. L'immunomarquage est ensuite réalisé comme décrit dans la partie VII.2.b « Immunogold sur culot d'exosomes ».

4. Microscopie électronique sur tranche d'hippocampe

(Collaboration Mireille Albrieux, Equipe 10, GIN)

Des nouveaux-nés de rat à P16 sont sacrifiés et des tranches d'hippocampe sont réalisées. Après récupération dans du liquide de Ringer pendant quelques minutes, les tranches sont incubées 1 minute dans les milieux contrôle ou de stimulation, puis fixées immédiatement dans du TP 0,1M - PFA 2% - glutaraldéhyde 0,2%, pendant 2h. Les étapes de post-fixation au tétroxyde d'osmium et de coloration l'acétate d'uranyl, puis de coupe, sont réalisées comme décrite dans la partie VII.3.a « Etude morphologique sur culture primaire ».

5. Microscopie électronique sur tranches d'hippocampe stimulés *in vivo*

(Collaboration Antoine Depaulis, Equipe 9, GIN)

Des rats sont stimulés soit par un milieu contrôle, soit par 20mM de kainate pendant 2h. Les hippocampes controlatéraux à la stimulation sont récupérés et fixés immédiatement dans du TP 0,1M - PFA 2% - glutaraldéhyde 0,2%, pendant 2h. Les étapes de post-fixation au tétroxyde d'osmium et de coloration l'acétate d'uranyl, puis de coupe, sont réalisées comme décrite dans la partie VII.3.a « Etude morphologique sur culture primaire ».

IX. Stimulation des cultures primaires

1. Milieux contrôle et dépolarisant

Les milieux sont préparés fraîchement à partir de solutions concentrées stock de chaque ion diluées dans de l'eau stérile. Les concentrations sont présentées dans le tableau suivant.

Solution	K5	K25	K50
CaCl ₂ .2 H ₂ O	1,8mM	1,8mM	1,8mM
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,8mM	0,8mM	0,8mM
NaCl	110mM	90mM	65mM
NaHCO ₃	26mM	26mM	26mM
Na ₂ HPO ₄ .2 H ₂ O	1mM	1mM	1mM
D-Glucose	40mM	40mM	40mM
Hépès pH 7.3	15mM	15mM	15mM
KCl	5mM	25mM	50mM

2. Agents chimiques utilisés sur les neurones

Le tableau suivant indique les concentrations d'utilisation de chaque molécule utilisée, ainsi que le fournisseur.

Produit	Concentration d'utilisation	Fournisseur
AMPA	100 μ M	Sigma
NMDA	50 μ M	Sigma
Glutamate	100 μ M	Sigma
Glycine	10 μ M	Euromedex
CNQX	100 μ M	Sigma
MK801	1 μ M	Sigma
TTX	5 μ M	Tocris
Bicuculline	40 μ M	Fluka
Picrotoxine	20 μ M	Sigma
Ionomycine	2 μ M	Sigma
BAPTA-AM	50 μ M	Sigma
Dynasore	40 et 80 μ M	Aronis
GW4869	5 et 10 μ M	Sigma

3. Protocole des stimulations

Les neurones corticaux sont stimulés à 15 DIV, et les neurones d'hippocampe à 21 DIV. Tous les milieux (contrôle, dépolarisation et avec les agonistes/antagonistes) sont préparés au dernier moment, et préchauffés à 37°C. Le milieu de culture est aspiré et les neurones sont rincés 2 fois en K5. Les neurones stimulés au NMDA et au Glutamate sont lavés au K5 – Mg (K5 sans MgSO₄). Ensuite, le milieu de dépolarisation ou contenant les agonistes/antagonistes est mis sur les neurones pendant le temps désiré, à l'étuve. Les stimulations au NMDA et au Glutamate sont réalisées dans du K5 – Mg. Les milieux sont ensuite récoltés, mis dans la glace en attendant d'appliquer le protocole de purification des exosomes. Les cellules sont directement mises dans du RIPA, à 4°C.

X. GFP-TTC

1. Production

Pour 1L de bactéries BL-21 transformées avec le plasmide pGEX contenant la construction GFP-TTC, l'induction est déclenchée par l'ajout de 40 μ M d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) à 28°C pendant 4h. Les bactéries sont culottées et resuspendues dans du PBS-NaCl 0,5M, puis lysées avec du lysosyme (1 mg/ml). Pour améliorer la lyse, on rajoute un mélange Triton X-100 1%, NP-40 1%, DNase (10 μ g/ml), MgCl₂ 2,5mM, 2h à température ambiante. Puis les bactéries sont soniquées plusieurs fois pendant 10 minutes. Le lysat est centrifugé à 48000g pendant 20 min, à 4°C. Le surnageant est passé dans une colonne G-sépharose (Glutathion-sépharose 4B, Amersham Biosciences). Les billes sont lavées au PBS-NaCl 0,5M, puis l'éluat est réalisé en présence de glutathion 5mM –Tris 50mM pH 8.3 –NaCl 0,5M. L'éluat est ensuite dialysé contre un grand volume de PBS-NaCl 0,5M-Glycérol 5%. Enfin, une étape d'ultracentrifugation (100 000g, 1h) permet d'enlever les agrégats de protéine GFP-TTC. Nous avons également réalisé une production de GFP, selon les mêmes conditions.

2. Incubation sur les neurones

La GFP-TTC (ou la GFP) est incubée sur les neurones (concentration finale 36nM) dans le milieu de culture la veille des stimulations. Le lendemain, les stimulations sont effectuées comme décrit précédemment.

XI. Marquage des cellules au PKH 67 (sigma)

Comme indiqué dans le protocole du fournisseur, les cellules (lignée BHK ou neurones corticaux) en solution sont culottés à 400g pendant 5 minutes. Le culot de cellules obtenu est repris dans 1ml du diluent C (fourni dans le kit). Le PKH67 est mélangé à 1ml de diluent C, puis ajouté aux cellules. Les cellules sont incubées avec le colorant pendant 5 minutes à température ambiante puis la réaction est stoppée par addition de sérum de veau fœtal 50% final. Les cellules sont à nouveau culottées, lavées deux fois dans leur milieu d'ensemencement avant d'être mises en culture normalement.

XII. Spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

Takamori et al (Cell, 2006) ont mis au point une méthode pour mesurer de nombreux paramètres sur des vésicules synaptiques, en utilisant la technique de la spectroscopie à corrélation de fluorescence. En utilisant le FM 1-43, un colorant lipidique fluorescent, ils ont pu déterminer la taille et la quantité de ces vésicules, ainsi que la masse de protéines et de lipide par vésicule.

Nous avons testé cette technique sur les exosomes sécrétés par les neurones corticaux, avec la collaboration d'Alexei Grichin, ingénieur de recherche à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble. Un culot 100 000g d'exosomes sécrétés pendant 5 minutes dans un milieu contrôle (K5) ou dépolarisant (K50) est repris dans du PBS à 4°C. Le FM 1-43 (10 μ M) est ajouté puis l'échantillon est analysé au microscope.

Article 1

Exosomes are released by cultured cortical neurones

(Molec. Cell. Neurosci. 31 (2006) 642-648)

J. Fauré, G. Lachenal, M. Court, J. Hirrlinger, C.
Chatellard-Causse, B. Blot, J. Grange, G. Schoen,
Y. Goldberg, V. Boyer, F. Kirchhoff, G; Raposo, J.
Garin, and R. Sadoul

Exosomes are released by cultured cortical neurones

J. Fauré,^a G. Lachenal,^a M. Court,^b J. Hirrlinger,^{d,e} C. Chatellard-Causse,^a B. Blot,^a
J. Grange,^a G. Schoehn,^c Y. Goldberg,^a V. Boyer,^a F. Kirchhoff,^{d,e} G. Raposo,^f
J. Garin,^b and R. Sadoul^{a,*}

^aLaboratoire Neurodégénérescence et Plasticité, INSERM-Université Joseph Fourier, Pavillon de Neurologie, Hôpital A. Michallon, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 9, France

^bLaboratoire de Chimie des Protéines, CEA-INSERM-Université Joseph Fourier, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

^cLaboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS-Université Joseph Fourier, EMBL Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, B.P. 181, 38042 Grenoble cedex 9, France

^dNeurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Hermann-Rein-Str. 3, 37075 Göttingen, Germany

^eDFG Research Center of Molecular Physiology of the Brain (CMPB), 37075 Göttingen, Germany

^fCentre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 144, Institut Curie, 75005 Paris, France

Received 13 April 2005; revised 6 December 2005; accepted 8 December 2005

Available online 30 January 2006

Accumulating evidence shows that several cell types have the capacity to secrete membrane proteins by incorporating them into exosomes, which are small lipid vesicles derived from the intraluminal membranes of multivesicular bodies (MVBs) of the endocytic pathway. Exosomes are expelled in the extracellular space upon fusion of the MVB with the plasma membrane. Exosomal release is a way of secreting membrane proteins meant to be discarded, or to be passed on to other cells. Here, we demonstrate, using primary cortical cultures, that neurones and astrocytes can secrete exosomes. We find that exosomes released by cortical neurones contain the L1 cell adhesion molecule, the GPI-anchored prion protein, and the GluR2/3 but not the NR1 subunits of glutamate receptors. We also show that exosomal release is regulated by depolarisation. Our observation suggests that exosomes may have a regulatory function at synapses and could also allow intercellular exchange of membrane proteins within the brain.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Exosomes; Alix; Tsg101; Prion; AMPA receptor; Neurones

Introduction

Endocytosed membrane receptors en route to the lysosome for degradation are selectively incorporated into vesicles budding inside multivesicular endosomal intermediates called multivesicular bodies (MVB) (Gruenberg and Stenmark, 2004). These intraluminal vesicles (ILVs) and their cargoes are then degraded upon fusion of the MVBs with lysosomes. In some cells,

however, MVBs can also fuse with the plasma membrane, thereby releasing ILVs in the extracellular milieu. Secretion of such extracellular vesicles, called exosomes, has been observed in reticulocytes, antigen presenting cells (APCs), intestinal epithelial cells and tumor cells (Fevrier and Raposo, 2004; Thery et al., 2002a,b). During reticulocyte differentiation, exosomal release is an alternative pathway to degradation, leading to the removal of excess transferrin receptors (Pan et al., 1985). Exosomes may also contribute to an intercellular mode of communication by allowing transfer of molecules from one cell to another. Indeed, exosomes secreted by APCs contain major histocompatibility complex class II antigens (MHC-II) (Thery et al., 1999, 2002a,b) and can be transferred to other APCs. This allows exosome-derived MHC-II loaded with antigenic peptide to be presented at the cell surface of the receiving APC (Morelli et al., 2004). Recent work, using a glial cell line overexpressing the prion protein (PrP), has shown that the cellular and scrapie forms of the protein (PrP^c and PrP^{sc} respectively) can be secreted in association with exosomes and that exosomes bearing PrP^{sc} are infectious (Fevrier et al., 2004). Exosomes could therefore allow the exchange of membrane proteins, susceptible to modulate membrane surface properties, but also allow the propagation of pathological proteins. This hypothesis could be highly relevant for the normal and pathological physiology of brain cells, and we therefore tested whether the latter have the capacity to secrete exosomes. Here, we demonstrate that primary cortical neurones release exosomes. We characterise the biochemical composition of these vesicles and demonstrate that exosomal secretion is regulated by depolarisation. Interestingly, we also show that the prion protein, the cell adhesion molecule L1 as well as subunits of the AMPA-type of glutamate receptors are associated with exosomal fractions.

* Corresponding author.

E-mail address: remy.sadoul@ujf-grenoble.fr (R. Sadoul)

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

Results

Rat cortical primary cultures secrete exosomes

We first tested whether exosomes are found in the medium of E16 rat cortical neurones cultured for 8 days. Cell culture supernatants were cleared from cell debris by two successive centrifugations at 2000 and 20,000 $\times g$. Membranes remaining in the medium were then pelleted at 100,000 $\times g$, resuspended in sucrose and fractionated by sedimentation on a continuous sucrose gradient. We analysed along this gradient the distribution of Alix, a cytoplasmic protein previously identified as a specific marker of exosomes derived from reticulocytes and dendritic cells (Geminard et al., 2004; Thery et al., 2001). Four to five fractions of the gradient contained Alix (Fig. 1 top), with a peak corresponding to a density of 1.13 g/ml (fractions 5 and 6). Electron microscopic analysis of the Alix positive fractions demonstrated the presence of vesicles with an average diameter of 100 nm (Fig. 1, bottom). The density and size of these vesicles are compatible with those described for exosomes purified from other cells (Thery et al., 2002a,b). We went on to analyse the proteins' content of these fractions by mass spectrometry (Table 1) and found that, among 19 proteins identified, 15 had already been described in exosomes prepared from other cells. Of the four remaining proteins, two are mainly expressed in astrocytes: GLAST1, which is a glutamate transporter (Storck et al., 1992), and the brain specific ceruloplasmin, which is a GPI-anchored ferroxidase (Patel and David, 1997). These data demonstrate that the medium from cortical primary cultures contains exosomes.

Characterisation of exosomal fractions

Exosomal fractions were further characterised by immunoblotting (Fig. 2). In all experiments, Alix positive fractions always

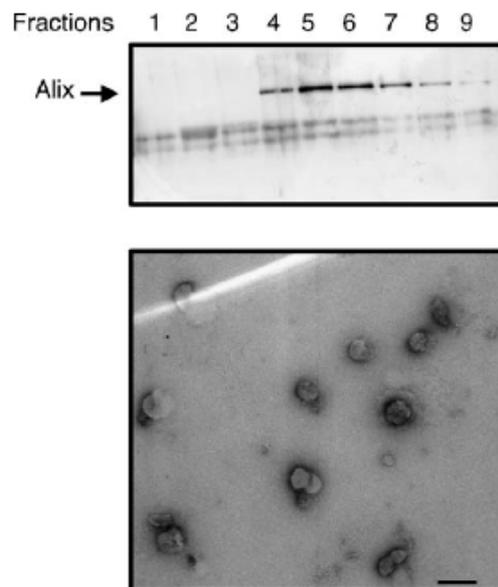


Fig. 1. Purification of exosomes from E16 rat cortical cultures. Top panel: membranes gathered in the medium of E16 rat cortical primary cultures were separated on a continuous sucrose gradient. One milliliter fractions were recovered, and proteins were precipitated with TCA/Doc, separated on SDS-PAGE and analysed by Western blotting using polyclonal anti-Alix (fraction 1 represents top of the gradient). Bottom panel: fractions 5 and 6 (corresponding to 1.125 and 1.14 g/ml sucrose) were pooled, negatively stained with 1% uranyl acetate and observed by electron microscopy. Scale bar: 200 nm.

Table 1

Proteins sequenced by LC-MS from exosomal fractions prepared from medium of E16 primary cultures of rat cortical neurones

	Protein	Matched peptides	Reference
Cytoskeleton associated	(P69897)	6	(Thery et al., 2001)
	Beta tubulin (P68370)	11	(Wubbolts et al., 2003)
	Alpha tubulin (P63259)	4	(Wubbolts et al., 2003)
	Gamma-actin (P10111)	1	(Pisitkun et al., 2004)
	Cyclophilin A (Q68FP1)	1	
Signaling	Gelsolin (P63102)	2	(Thery et al., 2001)
	14-3-3 zeta/delta (P29348)	1	(Pisitkun et al., 2004)
	Protein G, alpha subunit (P48037)	2	(Pisitkun et al., 2004)
Membrane trafficking	Annexin 6 (Q9QZA2)	1	(Thery et al., 2001)
	Alix (P11442)	4	(Wubbolts et al., 2003)
	Clathrin heavy chain (P63018)	3	(Thery et al., 2001)
	Hsc 70 (P62989)	1	(Pisitkun et al., 2004)
Enzymes	Ubiquitin (P11980)	2	(Wubbolts et al., 2003)
	Pyruvate kinase (P04797)	1	(Wubbolts et al., 2003)
	GAPDH (P10959)	2	(Pisitkun et al., 2004)
Membrane proteins	Carboxylesterase (Q794F9)	1	
	LLAT/CD98 (P24942)	1	
	GLAST 1 (P06238)	5	(Thery et al., 2001)
	Alpha-2-macroglobulin (P13635)	1	
	Ceruloplasmin		

Proteins already detected in exosomal preparations from other cell types are in bold, and a chosen reference is shown in the right column.

contained the Tsg101 protein (Fig. 2A). In fact, both cytoplasmic proteins, which interact together (Strack et al., 2003; von Schwedler et al., 2003), are part of the molecular machinery allowing vesicle budding inside MVBs (Katzmann et al., 2002; Raiborg et al., 2003) and are enriched in exosomes released by dendritic cells (Thery et al., 2001). However, the same fractions did not contain endophilins (Fig. 2A), which are other Alix interacting proteins (Chatellard-Causse et al., 2002) involved in endocytosis at the plasma membrane. We also found that exosomal fractions contain flotillin, a protein known to associate with lipid rafts and already described in exosomes (Fig. 2A) (de Gassart et al., 2003). The absence of the cytoskeletal MAP2 or Tau proteins in these fractions (Fig. 2A) argues that the membranes harvested from culture supernatants do not simply originate from cell debris. We then looked for proteins related to neuronal function in exosomal

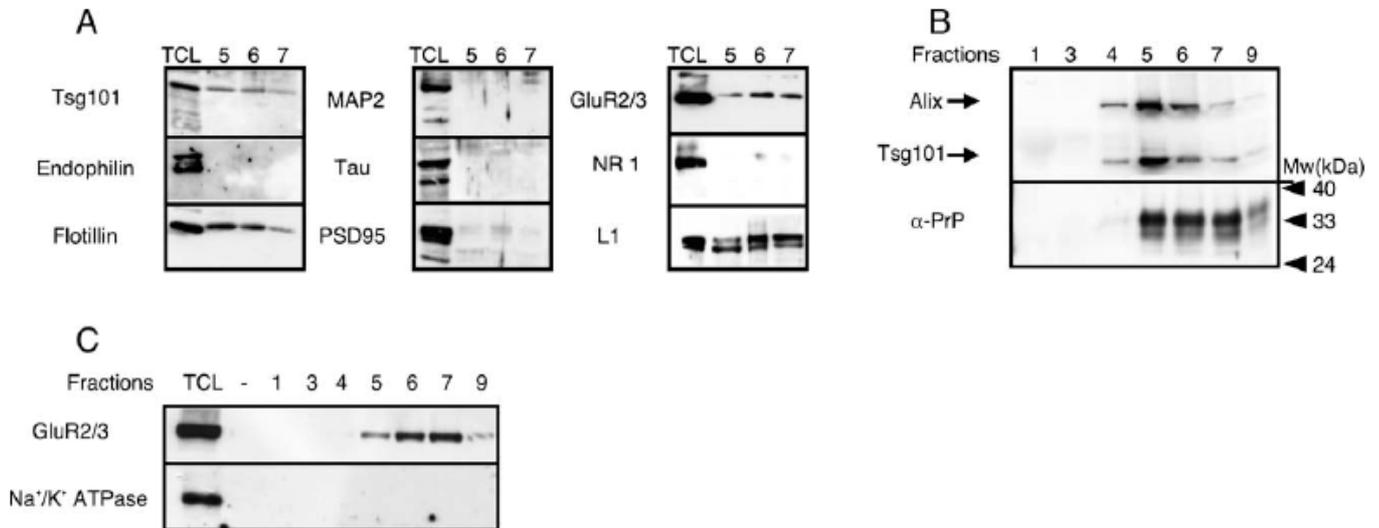


Fig. 2. Characterisation of exosome composition. (A) Western blot analysis of neurone lysates (TCL) and fractions 5, 6 and 7 (1.125 to 1.15 g/ml sucrose) of a density gradient, separating membranes from culture media processed as in Fig. 1, was carried out with the indicated antibodies. For each blot, the TCL lane represents 5 μ g proteins of total lysate of cells from which culture media were collected. (B) Endogenous PrPc is released in association with exosomes: PrPc detection on a sucrose gradient prepared as in Fig. 1. The same filter was reprobed with anti-Tsg101 and anti-Alix antibodies. (C) GluR2/3 positive fractions are not contaminated with plasma membrane: GluR2/3 detection on a sucrose density gradient prepared as in Fig. 1. The same fractions were probed with monoclonal anti- Na^+/K^+ ATPase.

fractions. We could easily detect a 100 kDa protein recognised by an anti-GluR2/3 antibody, but no protein corresponding to the NR1 subunit of the NMDA receptor (Fig. 2A). No immunoreactivity was detected against PSD95, a PDZ protein of the postsynaptic density anchoring glutamate receptors, thus excluding contamination of the fractions with synaptosomes. The release of prion protein together with exosomes has recently been demonstrated in ovine PrPc overexpressing cell lines (Fevrier and Raposo, 2004). In agreement with these findings, we detected the endogenous prion protein in the exosomes purified from primary neuronal cultures (Fig. 2B). No immunoreactivity against the plasma membrane Na^+/K^+ ATPase could be detected in GluR2/3 positive fractions from the density gradient (Fig. 2C). This demonstrates that the fractions containing exosomes are not contaminated with plasma membrane and strongly suggest that GluR2/3 and PrPc are secreted in association with exosomes.

Neurones secrete exosomes

The rat primary cortical cultures used to purify exosomes contain mainly neurones but also non-neuronal cells, even

though we limit proliferation of the latter by keeping them in absence of serum. Since, in the CNS, the cell adhesion molecule L1 is only expressed by neurones (Rathjen and Schachner, 1984), the fact that we find this protein in exosomes is a first demonstration that neurones can secrete exosomes (Fig. 2A). In order to prove this further, we made cortical cultures from Thy1.2-EYFP mice expressing the yellow fluorescent protein (YFP) specifically in neurones (Feng et al., 2000) and used the cytosolic YFP as a marker for exosomes. Indeed, vesicles budding from the limiting membrane towards the lumen of the endosome encapsulate cytosol, and we reasoned that they should therefore be filled with an overexpressed cytosolic protein. As expected in these cultures, neurones were the only cells expressing YFP (Fig. 3A). Analysis of supernatants prepared from these primary cell cultures demonstrated the presence of YFP in Alix and Tsg101 positive vesicular fractions isolated on a continuous sucrose gradient (Fig. 3B). Since YFP is soluble, its presence in fractions containing exosomes strongly suggests that it is entrapped inside these vesicles. This observation is a further demonstration that neurones do indeed secrete exosomes.

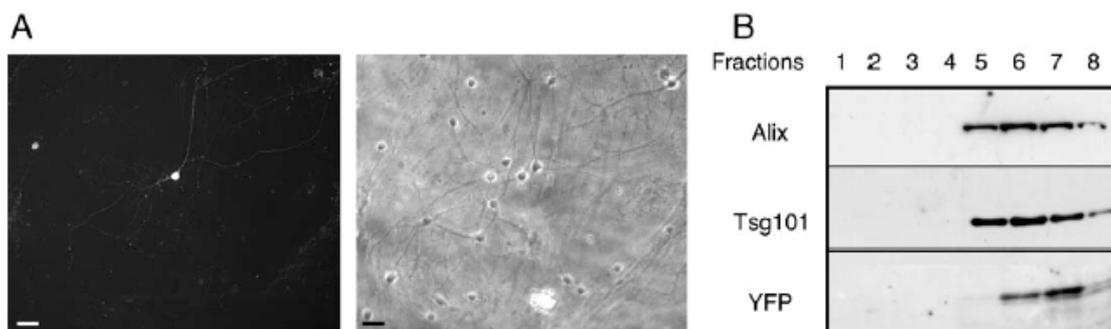


Fig. 3. Exosomes are secreted by neurones. (A) Cortical neurones were prepared from P0 pups by crossing Thy1.1-YFP heterozygote mice. Left panel shows typical YFP labeling of positive neurones in 8-day-old cultures. Right panel shows the same field in phase contrast. Scale bars = 20 μ m. (B) Serum-free culture supernatants from cortical neurones prepared as in panel A were processed as already described. Proteins contained in fractions of the density sucrose gradient were separated on SDS-PAGE and analysed on the same Western blot with anti-GFP, anti-Alix and anti-Tsg101 antibodies.

Exosome secretion can be regulated by depolarisation

We next asked the question of whether exosome release by neurones can be regulated by depolarisation. Cultures made from E19 rat cortex and kept for 9 days *in vitro* were washed and incubated in a basal medium containing either 5 mM KCl as a control (K5) or 25 mM KCl to depolarise them (K25). The K5 and K25 media were collected 3 h later, cleared from cell debris by two successive centrifugations (2000 and 20,000 $\times g$), and membranes were finally pelleted at 100,000 $\times g$. As seen in Fig. 4A, levels of membrane-associated Tsg101 and GluR2/3 secreted during 3 h were dramatically increased in K25 medium. Separation of the pelleted membranes on a continuous sucrose gradient demonstrated that GluR2/3 secreted by cells incubated in both control and depolarising media is associated with exosomal fractions (Fig. 4B). These results demonstrate that exosome secretion by neurones can be regulated in an activity-dependent manner.

We used immunogold labeling to provide further evidence that GluR2 released after neurone depolarisation is indeed associated with exosomes. As shown in Fig. 4C, vesicles released after depolarisation have the size and shape of exosomes, even though, as observed in other cell types, smaller vesicles are also present (Fig. 4D). Some of the exosomes were decorated by antibodies against GluR2 (Fig. 4E) and Alix (Fig. 4F). Noteworthy is that, even though staining with Alix required permeabilisation with saponin, staining with the anti-GluR2 antibody, which recognises

the extracellular N-terminal domain of the protein, did not require such a treatment. This demonstrates that the GluR2 subunit of the AMPA receptor has the expected outside-out orientation within the exosomal membrane.

Discussion

Here, we have demonstrated that supernatants of primary cortical cultures contain vesicles of density, size and composition typical of exosomes. We also show that neurones secrete integral membrane proteins such as the GluR2/3 subunits of the AMPA receptor, the specific cell adhesion molecule L1 and the GPI anchored prion protein, which are recovered in exosomal fractions. In contrast, other membrane proteins, like NR1 and the Na⁺/K⁺ ATPase, or cytoskeletal proteins (MAP2, Tau, PSD95) are not found in these fractions, thus suggesting that secretion of GluR2/3 occurs through exosomes. Finally, we demonstrate that exosome secretion is regulated by membrane depolarisation.

Secreted microvesicles in cortical culture medium are exosomes

Exosomes are microvesicles of endosomal origin released by selected cell types upon fusion of MVBs with the plasma membrane. We have shown that medium from primary cultures of rat cortical neurones contains vesicles floating on a sucrose

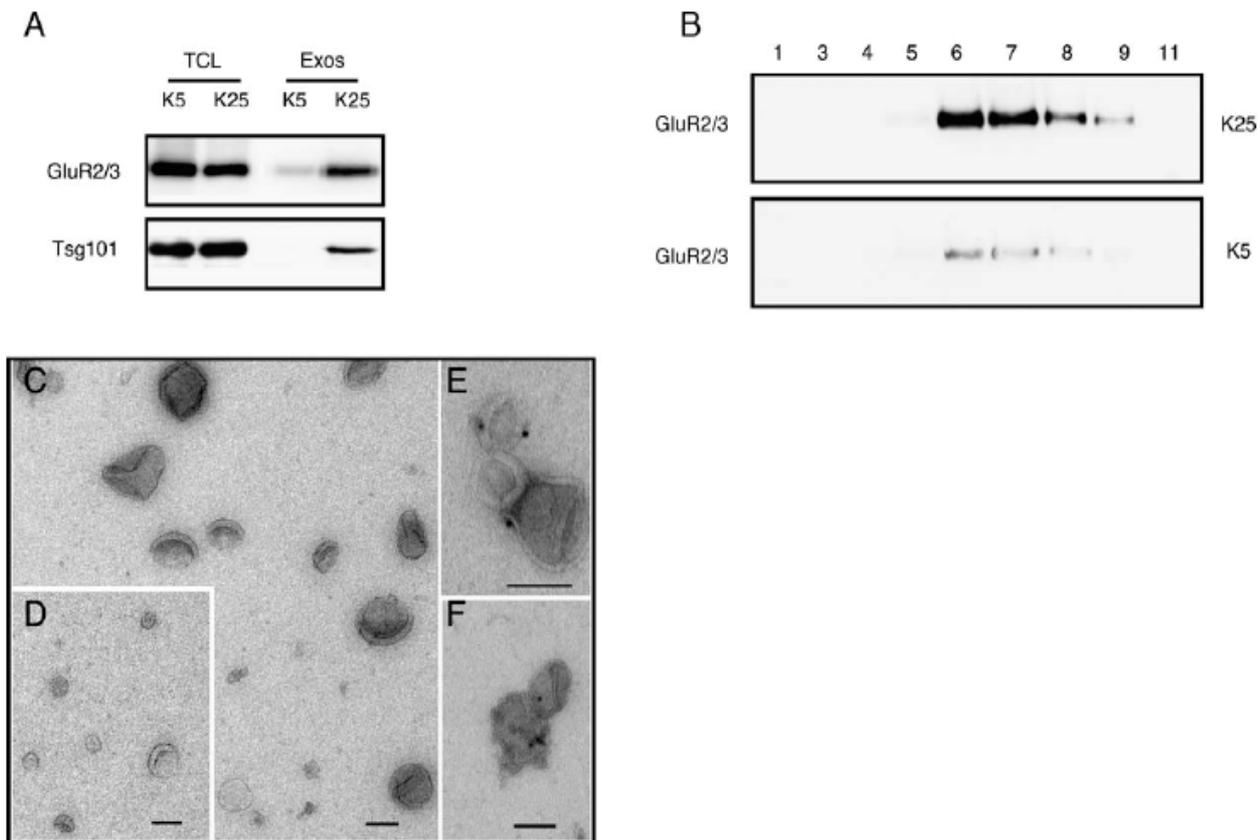


Fig. 4. Exosome secretion is stimulated by depolarisation. Top panel. (A) Exosomes present in the medium of E19 rat cortical primary cultures, incubated for 3 h in medium containing either 5 mM KCl (K5) or 25 mM KCl (K25), were recovered after centrifugation at 100,000 $\times g$. Proteins were separated on SDS-PAGE for Western blotting analysis using anti-GluR2/3 and anti-Tsg101 antibodies. Exos = exosomes, TCL = lysates. (B) Exosomes recovered in similar conditions as in panel A were further purified on continuous sucrose gradient. One milliliter fractions were recovered, treated as described in Fig. 1 and analysed by Western blotting with an anti-GluR2/3 antibody. Lower panel: electron micrographs of vesicles secreted by primary cortical cultures during a 3 h depolarisation. Vesicles were harvested using a 100,000 $\times g$ centrifugation of the depolarising medium containing 25 mM potassium. Photos C and D show a negative staining of the preparation. E and F show immunogold labeling of exosomes with anti-GluR2 antibodies (E) and with anti-Alix antibodies (F). Scale bars: 100 nm.

gradient at a density between 1.11 and 1.19 g/ml and with an average diameter of 100 nm. This clearly distinguishes exosomes from larger plasma membrane blebs sometimes released by cells (Thery et al., 2002a,b). Density centrifugation was used in our experiments as a preparative step in order to separate exosomes from protein aggregates and nucleosomal fragments released by apoptotic cells.

The demonstration by mass spectrometry and immunoblotting of the presence of Alix and Tsg101 in the fractions containing the vesicles strongly suggests that the latter originate from MVBs. Indeed, both proteins participate in the budding of intraluminal vesicles (ILVs) inside endosomes (Raiborg et al., 2003). We recently showed that MVB biogenesis is severely impaired in HeLa cells depleted of Alix by siRNA (Matsuo et al., 2004); and Tsg101, which interacts with Alix, is a known component of the so-called endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) necessary for the sorting of ubiquitinated proteins inside ILVs. The sequential association of ESCRT proteins with endosomes is catalysed by the ubiquitinated intracellular domain of transmembrane proteins (Katzmann et al., 2002), which are concentrated, after deubiquitination, in the membranes of ILVs. Another protein participating in MVB biogenesis is clathrin, which associates on these endosomes to form flat lattices (Sachse et al., 2002) and whose dissociation depends on Hsc70 activity (Newmyer and Schmid, 2001). The fact that we found all the above described proteins in the extracellular vesicles purified from cortical neurone cultures is a further proof of their endosomal origin. Beside ceruloplasmin and GLAST1, which are brain-specific, most of the proteins detected through mass spectrometry were already characterised in exosomes prepared from other cells (see references on Table 1). Another described characteristic of exosomes is their high content in cholesterol (Wubbolts et al., 2003). In line with this, our exosomal fractions contained flotillin and two proteins that contain a GPI anchor (PrPc and ceruloplasmin), known to concentrate within cholesterol-enriched microdomains. Hence, all the above described characteristics demonstrate that the vesicles released by cortical cells in culture are exosomes.

Exosomes heterogeneity in primary cortical cultures

Alix- or Tsg101-containing exosomes purified from our primary neuronal cultures are spread over 5 to 6 fractions within the density gradient. On the same gradient, exosomes detected with proteins expressed in neurones (GluR2/3 and L1 in Fig. 2, and the YFP in Fig. 3) are present in fewer fractions. One simple interpretation of these data is that antibodies against L1, GluR2/3 and YFP detect only neuronal exosomes as anti-Alix or anti-Tsg101 detect both neuronal and non-neuronal exosomes, revealing an heterogeneity in size and composition of these exosomes. In that respect, it is interesting to note that PrP positive exosomes have a density equivalent to that of L1 and GluR2/3 containing exosomes (Fig. 3), thus suggesting that, in these cultures, exosomal PrP is mainly secreted by neurones.

Regulation and function of exosome secretion

Our data suggest that exosome release is enhanced by potassium-induced depolarisation. In cortical neurones such as those used in our experiments, depolarisation leads to a massive entry of calcium. Our experiments are thus in good agreement with

findings that exosomal release by cells of an erythroleukemic cell line is enhanced upon rising intracellular calcium levels (Raposo et al., 1997; Savina et al., 2003, 2005). In neurones, the purpose of exosome release from MVBs, which are organelles already described in axons and dendrites (Cooney et al., 2002), may be to discard proteins or degradation products. This way of elimination seems particularly relevant for synapses, which lack lysosomes. Exosomes may thereby allow neurones to dispose of AMPA receptors, a mechanism that could be used during events like synaptic depression. Not all glutamate receptors are concerned by this particular type of removal since the NR1 subunit of the NMDA receptor was not detectable in exosomes. Using hippocampal neurones, Sheng and collaborators have recently observed that AMPA induces the internalisation of GluR2, which enters the recycling pathway. In contrast, NMDA leads to displacement of the endocytosed GluR2 towards MVBs (Lee et al., 2004). Our results beg the question of whether, and how, glutamate receptor exit through exosomes is modulated by synaptic activity.

By analogy to the situation in antigen presenting cells, one may hypothesise that exosomes are captured by neighboring cells, within which exosomal cargoes are dispatched. Fevrier et al. have recently shown that overexpressed PrPsc is released by cells of a glial cell line in association with exosomes that are infectious (Fevrier et al., 2004). Our result demonstrating that the endogenous prion protein is released with exosomes secreted by cultured cortical cells further supports the hypothesis that exosomes may contribute to the spreading of prions throughout the brain. The presence of some glutamate receptors within exosomes now begs the question of whether these secreted vesicles allow passing of ionic channels from neurone to neurone, thereby modifying their surface properties.

Experimental methods

Reagents

Anti-Alix antibody has been previously described (Chatellard-Causse et al., 2002). Anti-endophilin was a gift of P. De Camilli (University of Yale, CT, USA). The anti-prion (SAF 32) was a gift from J. Gagnon (CHU, Grenoble, France). Anti-L1 was a gift of F. Rathjen (Max-Delbrück-Centrum, Berlin, Germany), and anti-Na⁺/K⁺ ATPase was a gift from M-J Moutin (CEA Grenoble). Anti-Tsg101 antibodies were purchased from Genetex, anti-GluR2/3 and anti-Tau1 from Chemicon, anti-flotillin from Transduction Labs, anti-PSD95 from Upstate Biotech., anti-NR1 and anti-GluR2 (Clone 6C4) from Pharmingen, anti-MAP2 from Sigma and anti-GFP from Clontech.

Primary cultures of cortical neurones

Cells were dissociated from cortex of embryonic day 16 (E16) rat embryos as described (Ben Fredj et al., 2004). They were seeded at 5×10^5 cells/cm² onto 100 or 60 mm-diameter Petri dishes coated with poly-D-lysine (25 µg/ml, Sigma) and incubated in Neurobasal supplemented with B27 (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine and antibiotics in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. At day 5 of culture, 25% of freshly made complete medium was added.

Mouse cortical neurones from transgenic animals were prepared from P0 pups obtained by crossing heterozygous TgN(Thy1.2-EYFP) mice (Hirrlinger et al., 2005). After treatment in DMEM supplemented with 0.25% trypsin (Sigma) for 15 min at 37°C, mechanical dissociation was performed, and cells were seeded onto dishes coated with poly-L-lysine (0.5 mg/ml, Sigma). They were maintained in culture in DMEM supplemented with B27 and N2 (Invitrogen). At day 4 of culture, 25% of freshly made

complete medium supplemented with 10 μ M cytosine β -D-arabino-furanoside was added to inhibit cell proliferation.

Purification of exosomes

Medium from 8-day-old primary cultures (4 to 5 \times 10⁷ cells) was harvested and cleared of debris by two successive centrifugation steps (2000 \times g for 10 min, 20,000 \times g for 20 min). Membranes were recovered from the cleared medium by centrifugation for 45 min at 100,000 \times g. They were resuspended in 0.211 M sucrose, 3 mM imidazole pH 7.4 and loaded onto a continuous 0.3 to 1.4 M sucrose gradient. After 18 h of centrifugation at 100,000 \times g, 1 ml fractions were collected and precipitated with trichloroacetic acid/deoxycholate (TCA/Doc) for further analysis by Western blotting.

Effect of depolarisation on exosome release

Cells were dissociated from cortex of E19 rat embryos, cultivated as already described except that 10 μ M cytosine β -D-arabino-furanoside was added at 4 DIV in the medium to limit cell proliferation. After 9 DIV, cells were washed twice and incubated for 3 h at 37°C in serum-free medium containing 5 mM KCl (K5) or 25 mM KCl (K25). This basic medium was composed of 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 0.8 mM MgSO₄·7H₂O, 110 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 0.7% D-glucose and 15 mM HEPES, pH 7.4. For each condition, medium from 5 \times 10⁶ cells was recovered, and exosomes were pelleted after the 3 first steps of centrifugation described above. Exosome pellets were directly recovered in sample buffer for SDS-PAGE analysis or further purified on density gradient as described. Cells were lysed in 150 μ l RIPA buffer, and, for each condition, 10 μ l was loaded on SDS-PAGE.

Electron microscopy

For initial characterisation (Fig. 1), exosomal fractions from 4 to 5 \times 10⁷ cells isolated on a continuous sucrose gradient were diluted in 3 mM imidazole, pH 7.4 and pelleted by a 1 h centrifugation at 100,000 \times g. They were resuspended in a minimal volume of 0.2 M sucrose. Samples were applied to a grid covered by carbon and negatively stained with 1% uranyl acetate. Micrographs were taken under low-dose conditions with a JEOL 1200 EX II microscope at 100 kV and a calibrated magnification of 39,750 times (based on the helical pitch of Tobacco Mosaic Virus). Selected negatives were then digitised on a Zeiss scanner (Photoscan TD) with a pixel size of 14 μ m (3.5 Å at the sample scale).

Vesicles secreted after depolarisation were prepared and observed by electron microscopy as described (Fevrier et al., 2004). Samples of 5 μ l were allowed to adsorb for 20 min on Formvar-carbon-coated EM grids. Exosomal membranes on grids were fixed with glutaraldehyde 1%, washed in distilled water and contrasted and embedded immediately as detailed below. For immunogold labeling, after fixation with paraformaldehyde 2% for 30 min, membranes were single immunogold labeled with anti-GluR2 and anti-Alix antibodies followed by Protein A-gold 10 nm (PAG). Labeling with anti-Alix antibody was done after permeabilisation with 0.1% saponin for 30 min. Samples were contrasted and embedded in a mixture of methylcellulose and uranyl acetate and viewed under a CM120 Philips electron microscope (Eindhoven, The Netherlands).

Mass spectrometry analysis

Membranes present in the medium of E16 rat cortical primary cultures (4 to 5 \times 10⁷ cells) were separated on a continuous sucrose gradient as already described. Fractions 5 and 6 (corresponding to 1.125 to 1.14 g/ml sucrose) were pooled, diluted in 3 mM imidazole pH 7.4 and concentrated by centrifugation for 1 h at 100,000 \times g. The pellet was dissolved in sample buffer, and proteins were loaded on a 5–12% acrylamide gel for SDS-PAGE analysis. Proteins gathered at the interface between stacking and separating gels following a short migration were excised as a single

band, and submitted to trypsin digestion, for further analysis by LC-MS/MS as previously described (Ferro et al., 2002). MS and MS/MS data were acquired and processed automatically using MassLynx 3.5 software (Waters). Database searching was carried out on an updated compilation of SwissProt and TrEMBL (http://s.expasy.org/databases/sp_tr_nrdnb) using the MASCOT 1.7 program available intranet. Proteins which were identified with at least 2 peptides showing both a score higher than 40 were validated without any manual validation. For proteins identified with only one peptide, the sequence of the peptide was checked manually.

Acknowledgments

This work was supported in part by INSERM, the University Joseph Fourier, grants from “the ‘Association Française contre les Myopathies’ (R.S.) and DFG Center (CPMB) (F.K.). J.F. was supported by a fellowship from French ‘Ligue Nationale contre le Cancer’. Thanks to P. Rostaing (ENS, Paris) for the gift of the 6C4 antibodies, F. Hemming and K. Sadoul (IAB, Grenoble) for critical reading of the manuscript, and S. Gory for help with the mouse cortical cultures.

References

- Ben Fredj, N., Grange, J., Sadoul, R., Richard, S., Goldberg, Y., Boyer, V., 2004. Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 117, 1079–1090.
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M., Sadoul, R., 2002. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J. Biol. Chem.* 277, 29108–29115.
- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M., Fiala, J.C., 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci.* 22, 2215–2224.
- de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., Vidal, M., 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336–4344.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., Sanes, J.R., 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51.
- Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., Verjat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N., 2002. Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11487–11492.
- Fevrier, B., 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., Raposo, G., 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9683–9688.
- Geminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., 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.
- Gruenberg, J., Stenmark, H., 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 5, 317–323.
- Hirrlinger, P.G., Scheller, A., Braun, C., Quintela-Schneider, M., Fuss, B., Hirrlinger, J., Kirchhoff, F., 2005. Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 30 (3), 291–303.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., Emr, S.D., 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 3, 893–905.

- Lee, S.H., Simonetta, A., Sheng, M., 2004. Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* 43, 221–236.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Vilbois, F., Gruenberg, J., 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303, 531–534.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo Jr., L.D., Thomson, A.W., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266.
- Newmyer, S.L., Schmid, S.L., 2001. Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *J. Cell Biol.* 152, 607–620.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948.
- Patel, B.N., David, S., 1997. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 20185–20190.
- Pisitkun, T., Shen, R.F., Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13368–13377.
- Raiborg, C., Rusten, T.E., Stenmark, H., 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 446–455.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., 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 (12), 2631–2645.
- Rathjen, F.G., Schachner, M., 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* 3, 1–10.
- Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G.J., Klumperman, J., 2002. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 13, 1313–1328.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., Colombo, M.I., 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 278 (22), 20083–20090.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., Colombo, M.I., 2005. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6 (2), 131–143.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10955–10959.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., Gottlinger, H.G., 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689–699.
- Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S., 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* 147, 599–610.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., Amigorena, S., 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* 166, 7309–7318.
- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., Amigorena, S., 2002a. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3, 1156–1162.
- Thery, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002b. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev., Immunol.* 2, 569–579.
- von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimbara, D.M., Scott, A., Krausslich, H.G., Kaplan, J., Morham, S.G., Sundquist, W.I., 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701–713.
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoemschemeyer, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., 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.

Article 1 : Sécrétion des exosomes par les neurones corticaux en culture.

Nous avons pu montrer au cours de ces premiers travaux que les neurones corticaux en culture sécrètent des exosomes auxquels sont associées des protéines exosomales classiques, comme Alix, Tsg101, et la flotilline, et également des protéines neuronales, comme la molécule d'adhésion neuronale L1 et les sous unités GluR2/3 des récepteurs au glutamate. De façon très intéressante, la protéine du prion cellulaire (PrPc) est également présente dans les exosomes sécrétés dans ces cultures. Enfin, une dépolarisation de la culture dans un milieu hyperpotassique permet d'augmenter de façon drastique la sécrétion d'exosomes, ce qui montre qu'il existe une régulation de la production des exosomes par l'activité neuronale.

Résultats

1. Purification des exosomes de cultures primaires de neurones corticaux

Après avoir établi un protocole de purification d'exosomes à partir d'une lignée cellulaire disponible au laboratoire, et mis au point la culture de neurones de cortex provenant d'embryons de rat (E18), nous avons appliqué le protocole de purification sur le milieu des neurones à 8 jours de culture *in vitro*. La purification sur gradient de sucrose a révélé la présence de la protéine Alix dans les fractions centrales (1,11 à 1,19 g/ml), ce qui témoigne de l'existence d'exosomes dans le surnageant de culture des neurones. En collaboration avec Graça Raposo de l'institut Curie à Paris, nous avons pu observer en microscopie électronique les vésicules contenues dans les fractions centrales du gradient (5-6). La population de vésicules est homogène, d'environ 100nm, ce qui confirme qu'il s'agit bien d'exosomes.

2. Protéines sécrétées par les exosomes de culture primaire de neurones corticaux

Nous avons ensuite réalisé une étude en spectrométrie de masse, grâce à une collaboration avec Jérôme Garin du CEA de Grenoble, pour détailler les protéines présentes dans les exosomes sécrétés par les cultures primaires de neurones corticaux. La spectrométrie de masse a révélé la présence de protéines déjà décrites dans les exosomes des autres types cellulaires : tubuline, actine, protéine α , Alix, clathrine, Hsc70, pyruvate kinase, 14-3-3, GAPDH.

Nous avons poursuivi l'analyse protéomique des exosomes par Western-blot, et nous avons pu détecter les protéines Tsg101 du complexe ESCRT I et la flotilline. Nous avons également révélé la présence de la molécule d'adhésion cellulaire L1, qui est une protéine exprimée spécifiquement dans les neurones au niveau du système nerveux central, et des sous-unités GluR2 ou 3 (l'anticorps reconnaît la partie commune aux deux sous-unités) des récepteurs au glutamate. Aucune présence de protéines du cytosquelette (MAP2, Tau) ni de l'enzyme membranaire Na^+/K^+ ATPase n'a été détectée dans les fractions Alix-positives, ce qui montre qu'elles ne sont pas contaminées par des débris cellulaires, ni des morceaux de membrane plasmique. Enfin, la protéine PrPc se retrouve également dans ces fractions, confirmant comme Février et al l'avaient suggéré en 2004, que la protéine peut emprunter cette voie pour être sécrétée dans le milieu extracellulaire.

L'approche protéomique a également montré la présence de Glst1 dans les exosomes sécrétés cultures de neurones corticaux. Glst1 est un transporteur membranaire exprimé spécifiquement par les cellules gliales. Cette observation démontre que les cellules gliales qui sont toujours présentes dans les cultures primaires de neurones corticaux malgré l'ajout d'AraC, sécrètent elles aussi des exosomes. Ces résultats ont été confirmés par Taylor et al en 2007, qui montrent que les astrocytes en culture sécrètent des exosomes.

Pour confirmer l'existence d'exosomes neuronaux, nous avons utilisé des neurones corticaux prélevés chez la souris transgénique Thy-1-YFP, qui surexprime la YFP (*Yellow fluorescent protein*) sous la dépendance du promoteur du gène Thy-1, qui restreint l'expression de la YFP aux neurones. La YFP soluble dans le cytosol remplit les vésicules intraluminales au cours de leur formation dans les endosomes. Les exosomes récoltés dans ces cultures contiennent la YFP, ce qui confirme que les neurones sécrètent des exosomes.

3. Hétérogénéité des exosomes des cultures corticales

Alix et Tsg101 colocalisent parfaitement dans des fractions étendues entre 1.12 et 1.19 g/ml de sucrose, tandis que PrPc, GluR2/3 et L1 sont restreints aux fractions allant de 1.15 à 1.19 g/ml de sucrose. Alix et Tsg101 étant exprimées de façon ubiquitaire, ces marqueurs exosomaux sont certainement présents dans les exosomes neuronaux, mais aussi les exosomes des cellules gliales. En revanche, L1 est exclusivement neuronal, et GluR2/3 est majoritairement exprimé dans les neurones, même si certaines études montrent une expression des GluR dans les astrocytes (Fan et al, 1999). Ces deux protéines marqueraient donc préférentiellement les exosomes neuronaux, qui seraient une sous-population de l'ensemble

des exosomes trouvés dans les cultures primaires de cortex. Les fractions contenant PrPc correspondent à cette sous-population, ce qui suggère que cette protéine est bien présente dans les exosomes d'origine neuronale.

4. Morphologie des exosomes et immunogold

Nous avons pu montrer que les exosomes sécrétés par les cultures de neurones corticaux ont également la même forme « en hématie » que les exosomes des autres types cellulaires, par l'observation en microscopie électronique des vésicules contenues dans les fractions centrales (5-6-7) d'un gradient. Leur taille est d'environ 100nm. Des immunogold pratiqués sur ces exosomes confirment la présence d'Alix et de GluR2 dans ces vésicules.

5. Régulation de la production d'exosomes par l'activité neuronale

L'activité spontanée des cultures neuronales peut être augmentée en élevant la concentration extracellulaire en potassium. Cette élévation conduit à une dépolarisation de la membrane neuronale, et facilite ainsi le déclenchement des potentiels d'action. Nous avons incubé les neurones corticaux dans un milieu contrôle (contenant 5mM de potassium, potentiel de membrane : -65mV) ou dans un milieu dépolarisant (25mM de potassium, potentiel de membrane : -30mV) pendant 3h, puis purifié les exosomes sécrétés sur gradient de sucrose. La détection du marqueur exosomal tsg101 (non montré) et de GluR2/3 nous a permis de montrer que l'augmentation de l'activité neuronale accroît de façon très importante la production d'exosomes par les cultures. Le temps long d'incubation ne permet pas de savoir si cette augmentation d'exosomes dans le milieu extracellulaire provient de l'augmentation de la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique, ou indirectement d'une augmentation de l'endocytose due à l'activité neuronale accrue.

Article 2

Differentiated cortical neurons release exosomes in a way regulated by synaptic glutamatergic activity

(soumis pour publication)

Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming
F, Belly A, Bodon G, Haase G, Goldberg Y, and
Sadoul R.

Cellular & Molecular

Differentiated cortical neurons release exosomes in a way regulated by synaptic glutamatergic activity

Gaëlle Lachenal^{1,3}, Karin Pernet-Gallay^{2,3}, Mathilde Chivet^{1,3}, Fiona Hemming^{1,3}, Agnès Belly^{1,3}, Gilles Bodon^{1,3}, Georg Haase⁴, Yves Goldberg^{1,3}, and Rémy Sadoul^{1,3}.

Abbreviated title: neuronal exosomes

1 INSERM, U836, Equipe 2, Neurodégénérescence et Plasticité, Grenoble, F-38042, France

2 INSERM, U836, Equipe 1, Physiopathologie du Cytosquelette, Grenoble, F-38042, France

3 Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, F-38042, France

4 INSERM, U129, Institut Cochin de génétique moléculaire, Paris, 75014, France

Corresponding author : Rémy Sadoul, Grenoble Institute of Neuroscience, Chemin Fortuné Ferrini, BP 170, F- 38042 Grenoble, France.

remy.sadoul@ujf-grenoble.fr

Abstract

Shedding of microvesicles by living cells has received a lot of attention since it represents ways not only for discarding proteins and metabolites but also for intercellular exchange of proteins and RNAs. Exosomes are microvesicles released into the extracellular medium upon fusion to the plasma membrane of endosomal intermediates called multivesicular bodies. In a previous study we showed that developing cortical neurons are capable of releasing exosomes which contain among others, the prion protein, the L1 adhesion molecule and subunits of AMPA receptors (Fauré et al, 2006). Here we extended these results using biochemistry, electron microscopy and fast video microscopy to demonstrate that mature cortical and hippocampal neurons in culture secrete exosomes from somato-dendritic compartments. We also show that exosomal release is modulated by glutamatergic synaptic activity thus suggesting that this process might be part of normal synaptic physiology.

Introduction

It is today clear that cell to cell communication can occur through exchange of bioactive membrane vesicles. These can bud directly from the plasma membrane (PM –derived microparticles) or inside multivesicular endosomes. In this latter case fusion of multivesicular bodies (MVBs) to the plasma membrane allows the release of their intraluminal vesicles, which once in the extracellular milieu are referred to as exosomes. The latter are homogeneous in size (40-100nm) and shape and even though their protein composition depends on the cell type of origin, some proteins like the tetraspanin CD63 have emerged as exosomal marker proteins. MVBs were first described as intermediates, which individualize from early endosomes and fuse later on with lysosomes, where hydrolysis of their content occurs. This is a way for degradation of endocytosed cell surface receptors, which are entrapped into the vesicles budding from the limiting membrane, into the lumen of endosomes. In some cases, electron microscopy observations revealed that MVBs can also fuse with the plasma membrane to allow release of exosomes.

Since their original discovery in reticulocytes, exosomes were reported to be secreted by an increasing number of cells and could be isolated from most body fluids including cerebral spinal fluid (Vella et al, 2008). However, in most cases their physiological relevance has been difficult to show due to a lack of information on their biogenesis, origin and ways of regulation. Exosomes represent an alternative pathway for secretion of soluble proteins lacking signal sequences or of membrane proteins. Exosomal release instead of lysosomal degradation also allows removal of membrane material for cells, or cell compartments, lacking lysosomes (Pan et al, 1985). Other functions deal with intercellular communication as in the case of naïve dendritic cells which become immunocompetent after endocytosis of exosomes secreted by other activated dendritic cells (Thery et al, 2002, Morelli et al, 2004). Tumor cells can also manipulate neighbouring cells by way of exosomes particularly by favouring angiogenesis. Recently several groups have demonstrated that exosomes released by mast cells, monocytes or glioblastomas contain small RNAs including microRNAs and mRNAs which modulate protein expression of receiving cells (Valadi et al, 2007). Thus, exosomes represent a way of intercellular exchange of material, which allows an emitting cell to modify protein expression of receiving cells.

Several years ago, we reported that developing cortical neurons secrete exosomes (Fauré et al, 2006) containing the prion protein PrPc, the L1 adhesion molecule and subunits of the AMPA receptor. This contributed to the hypothesis that in the nervous system, exosomes could participate in normal physiology but also in spreading of pathological agents. Here we

extended this work by showing that release of exosomes also occurs from fully differentiated cortical neurons. Furthermore we could detect short term secretion of exosomes and demonstrated that this is regulated by calcium influx and by glutamatergic synaptic activity. Using electron microscopy we observed packets of exosomes being secreted from neurons. The C terminal-half of tetanus-toxin, which was endocytosed and accumulated inside MVBs was secreted by way of exosomes, thus demonstrating that these latter stem from MVBs. This was further demonstrated using fast video microscopy to follow the decrease in fluorescence of compartments labelled by CD63-GFP, known to concentrate inside MVBs. Thus our results demonstrate that fully differentiated neurons secrete exosomes originating from MVBs and that this process is regulated by synaptic activity.

Material and Methods

Reagents:

Polyclonal anti-Alix has been previously described (Chatellard-Causse et al, 2002). Polyclonal anti-L1 CAM was a kind gift of F. Rathjen (Max-Delbrück-Centrum, Berlin, Germany). Polyclonal anti-GluR2 and anti-GluR2/3 were purchased from Millipore and Chemicon respectively. Monoclonal antibody against the N-terminal part of GluR2 used for electron microscopy was from Chemicon. Monoclonal anti-GFP was from Covance, and monoclonal antibody against flotillin was obtained from BD Transduction Laboratories. Bicucullin, CNQX, MK801 were from Sigma. Tetrodotoxin was purchased from Tocris. GST-GFP-TTC and GST-GFP proteins were purified as described in Bordet et al, 2001.

Primary cultures of cortical and hippocampal neurons:

Cells were prepared from embryonic day 19 (E19) rat embryos as described (Fauré et al, 2006). After dissociation cells were seeded at 10^5 cells/cm² onto 100mm dishes coated with poly-D-lysine (50µg/ml, Sigma). In the case of hippocampal neurons, cells were seeded at 1.3×10^4 cells/cm². Cells were cultured in Neurobasal (Gibco) supplemented with B27 (2%), 1mM sodium pyruvate, 2mM glutamine and antibiotics in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. 25% of freshly made medium containing cytosine β-D-arabinooside (AraC) at a final concentration of 10µM (cortical neurons) or 5µM (hippocampal neurons) was added every 4th day.

Purification of exosomes:

Exosomes were purified from 15 DIV cultures in case of cortical neurons and 21 DIV in case of hippocampal neurons. Cells were washed two times in K5 medium (5mM KCl, 1.8mM CaCl₂·2H₂O, 0.8mM MgSO₄·7H₂O, 110mM NaCl, 26mM NaHCO₃, 1mM NaH₂PO₄·2H₂O, 0.7% D-Glucose and 15mM HEPES, pH 7.4) and incubated in the same medium for the indicated times. Collected media were cleared from debris by two successive centrifugation steps (2000g for 10 minutes, 20 000g for 20 minutes) and filtration through a 0.22 µm filter (GVA, Millipore). Exosomes were recovered by centrifugation for 50 minutes at 100 000g. They were resuspended in Laemmli buffer for western blot analysis or further separated over a sucrose gradient. For this, the 100 000g pellets were resuspended in sucrose 0.211M, 3mM Imidazole pH 7.4, and loaded onto a continuous 0.211M to 2.255M sucrose gradient. Gradients were centrifuged 18h at 100 000g, and one ml fractions were collected, diluted in Imidazole 3mM pH 7.4, and centrifuged for 1h at 100 000g. Pellets were resuspended in Laemmli buffer and analysed by western-blot.

Ionomycin was used at 2µM, BAPTA-AM at 50µM, Tetrodotoxin (TTX) at 5µM, Bicucullin at 40µM, MK801 at 1µM, CNQX at 100µM. Hippocampal neurons were stimulated at day 21 of culture in control medium or control medium containing Ionomycin 2µM.

Semi-quantification analysis of western blots:

Autoradiographs were scanned (Duoscan f40, AGFA) at 800dpi. Total grey value were obtained using Metamorph software (Meta Imaging Series Version 7.5.6.0., MDS Analytical Technologies). For each experiment, triplicates were made from at least three different cultures. Histograms represent the means of ratios between each grey value of one exosomal pellet to the corresponding lysate. Wilcoxon and ANOVA tests were applied according to experiments, as precised in figure legends (* 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01, *** 0.0001<p<0.001).

Electron microscopy:

Exosomes pellets were immediately fixed by 2% paraformaldehyde, and then applied to Formvar-carbon-coated EM grids. They were negatively stained with 5% uranyl acetate for 1 minute. For immunogold labelling, grids were incubated with indicated primary antibodies, detected by protein A gold and stained with uranyl acetate as described above. Observations were made using a transmission electron microscope (JEOL JEM 1200 EX) at 80kV, and with a numeric camera (Veleta, SIS).

For morphological analyses, cultures of cortical or hippocampal neurons were stimulated for 1 minute with 2 μ M ionomycin. Neurons were then immediately fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1M pH 7.2, for at least two hours. Neurons were post-fixed by 1% osmium tetroxyde in cacodylate buffer 0.1M for 1h and stained overnight in 0.5% uranyl acetate. The day after, cells were washed and dehydrated in graded series of ethanol before inclusion in Epoxy resine (Flukka, Sigma). Ultrathin sections of 70 nm were made with an ultramicrotome (Leica, ultracut S), placed on grids and stained with uranyl acetate 5% and lead citrate.

For immunogold labelling, cells were incubated overnight with GFP-TTC. The day after, cultures were washed three times in K5 medium before incubation with 2 μ M ionomycin during 1 minute and fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were then incubated with anti-GFP antibodies and protein A coupled to gold particule before inclusion as described above.

For cryomicroscopy, neurons were incubated overnight with GFP-TTC. The day after, cells were washed three times in K5 medium and fixed with 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1M. Cells were scratched off the substrated and centrifuged at 1200rpm for 5 minutes. Pellets were then embedded in gelatine, cryo-protected in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Sections of 70 nm were made using a cryo-ultramicrotome (Reichert Ultracut S, Leica) and immunolabelling was further processed according to Tokuyasu protocol.

Results

Regulation of exosomal release from 15 DIV cultures of primary cortical neurons is regulated by calcium.

We have already demonstrated that primary neurons from rat E 19 cortex cultured for 9 days in culture release exosomes and that this release is stimulated during a 3h depolarisation with a medium containing 25 mM KCl. These cultures are not fully differentiated meaning that neurite outgrowth still occurs and that very little synapses can be observed. In order to show that exosomal release is not only the property of developing neurons we repeated these experiments with the same type of neurons cultured for 15 days to allow full differentiation. Vesicles harvested by ultracentrifugation from culture supernatant of 15 DIV neurons cultured in 5 or 25 mM KCl for 3 hours were further separated using a continuous sucrose gradient and immunoblotted with antibodies against flotillin and Alix, two proteins enriched in exosomes. Immunoreactivity was detected between fractions 4 and 7, which correspond to densities of 1.09 and 1.15 g/ml sucrose which are expected for exosomes (Fig. 1). Flotillin

immunoreactivity reveals that depolarising mature neurons in K25 medium increased exosomal release, as previously shown for 8 DIV neurons (Fauré et al, 2006). L1, which in the central nervous system is only expressed by neurons, was present in exosomal fractions showing that exosomes are released from neurons. AMPAR subunits of glutamate receptors were also detected in exosomes secreted by mature neurons.

In order to examine whether secretion of exosomes is regulated, we decreased the time of harvest to 5 minutes. We first demonstrated using electron microscopy that exosomes can be pelleted from fresh medium incubated for 5 minutes on 15 days old cultures. We showed that the released vesicles harvested by 100 000g centrifugation had the size and erythrocyte-like shape typical of exosomes (Fig. 2A). Furthermore these vesicles were decorated with antibodies against the neuron adhesion molecule L1 (Fig. 2B) and the AMPA receptor subunit GluR2 (Fig. 2C) as already reported for exosomes released by 9 DIV cortical neurons during a 3 hour depolarisation. Using western blot analysis with anti-flotillin, anti-Alix and L1, we found that inducing calcium influx by incubating neurons with the ionophore ionomycin during the 5 minutes time of harvest, significantly increased exosomal release (Fig. 3A and B). A similar result was found using 21 DIV old hippocampal neurons (Fig. 3C). Preincubation for 2h of the cortical neurons with BAPTA-AM able to chelate intracellular calcium, blocked the ionomycin effect, thus demonstrating that the enhancement of exosomal release observed during a 5 minutes incubation with the ionophore is due to an increase in intracellular calcium (Fig. 3D and E). Noteworthy is that western blot analysis did not allow us to demonstrate any significant increase of exosomal release during a 5 minute depolarisation (not shown). This might reflect a lack of sensitivity and a lower increase in intracellular calcium induced by depolarisation compared to that induced by ionomycin.

Electron-microscopic examination of cultured neurons demonstrate the presence of released exosomes in close apposition to the plasma membrane

Electron microscopy examination 15 DIV cortical neurons treated one minute with ionomycin showed the presence of extracellular aggregates of vesicles in close vicinity to the plasma membrane of dendrites (Fig. 4B) and of soma (not shown). Similar aggregates were seen using 8 DIV cultures (Fig. 4A). The appearance and size (60 to 80 nm) were similar to those observed inside intracellular compartments having the appearance of MVBs and also to those of vesicles harvested from culture supernatants (Fig. 2). In a few cases images of MVB compartments in continuity with the plasma membrane could be seen (Fig. 4C). In this case a dense material probably contained in MVBs was released together with exosomes.

In order to further prove that exosomes harvested by centrifugation and observed in association with dendrites stem from neuronal endosomal compartments, we used the C terminal fragment of Tetanus toxin (TeNT) fused to GST and GFP (GFP-TTC). Numerous observations have shown that the TTC fragment retains specific neuronal binding and uptake properties similar to those of the native toxin (Maskos et al, 2002).

Purified recombinant GFP-TTC or GFP was incubated on 15 DIV cortical neurons for 1h at 37°C followed by extensive washing. The cells were then incubated for five minutes in fresh medium and vesicles harvested by centrifugation at 100 000g and analysed by western-blotting using anti-GFP and anti-flotillin antibodies. GFP-TTC, but not GFP, was present in these 100 000g pellets suggesting that GFP-TTC is released in association with exosomes (Fig 5A). We performed density separation on a sucrose gradient of material secreted during 2h by neurons preincubated with GFP-TTC. Besides aggregated GFP-TTC at the bottom of the gradient, we observed a peak of GFP-TTC in the 1,12 g/ml fraction, in which flotillin positive exosomes are concentrated (Fig.5B). Thus, exosomes harvested from cultured neurons stem from intracellular compartments, which contain endocytosed proteins.

Using immunogold labelling of cryo-sections, we demonstrated that anti-GFP labels MVB compartments of cultured neurons pre-incubated with GFP-TTC (Fig 5C). This is in good agreement with results of Schiavo and collaborators who have reported accumulation of TTC-GFP inside these compartments.

Anti-GFP labelling before inclusion and sectioning of the cultured neurons demonstrated the presence of immunogold labelling in packets of exosomes apposed to the dendritic surface (Fig 5C). Thus, our experiments strongly suggest that packets of exosomes seen in association with dendrites of 15 DIV cultured neurons correspond to intraluminal vesicles of MVBs released upon fusion of the latter with the plasma membrane. It is also the first demonstration that a protein capable of crossing synapses associates with exosomes.

Exosome secretion is regulated by glutamatergic activity

We used two antagonists of GABA_A receptors, picrotoxin and bicucullin, to block inhibitory activity in the cultures and thereby enhance glutamatergic spontaneous activity. As shown on Fig. 6, release of exosomes detected by flotillin, Alix and L1 was already increased after 10 min treatment with bicucullin. Addition of the AMPAR antagonist CNQX to the cultures together with bicucullin inhibited this increase. MK-801, which antagonises NMDA receptors, also blocked the bicucullin-induced increase in exosome secretion (Fig.6A and B). Therefore exosome secretion is modulated by synaptic AMPA and NMDA receptors activity.

Picrotoxin also increased the release of exosomes immuno-revealed using anti flotillin and GluR2, further demonstrating that this process is regulated by synaptic glutamatergic activity.

Discussion

Release of vesicles from living cells is the subject of numerous studies as they represent ways of secretion of membrane proteins and of RNAs. Vesicles can be released from intracellular compartments like MVBs, or of unknown origin as in the case of enlargeosome released by PC12 cells. Secretion from membrane particles was also demonstrated to occur directly from the plasma membrane of neuroepithelial cells. Here we used several techniques to show that differentiated cortical and hippocampal neurons release exosomes.

Our demonstration that the features of vesicles released by differentiated neurons correspond to those of exosomes is three fold: 1) their densities of 1.09 to 1.15 g/ml and Alix and flotillin- immunoreactivities; 2) their size and shape as observed by EM; 3) the presence of packs of vesicles near dendrites, which have the size and shape similar to those of ILVs found inside MVBs. Interestingly packs of 10 to 15 released exosomes, which is the approximate number of ILVs of MVBs, remain bound to the plasma membrane as described in the case of exosomes secreted by B cells (Raposo et al, 1996). As already observed for exosomes secreted from 8DIV cultures exosomes, exosomes from 15 DIV cultures carried the cell adhesion molecule L1 and GluR2/3 subunits of AMPA receptors. The presence of both proteins inside MVBs, which was reported by others reinforces our hypothesis that exosomes characterised in our study correspond to MVB intraluminal vesicles. Our previous demonstration of exosomal release was performed using E 19 rat cortical neurons cultured for 8 to 9 days (Fauré et al, 2006). At this stage neurite outgrowth is still ongoing and little synaptogenesis has occurred. Several observations have implicated TI-VAMP/ VAMP7 in lysosome secretion. Using primary sympathetic neurons Arantes and Andrews have demonstrated that TI-VAMP co-localises with LAMP1 and synaptotagmin VII in endosomal compartments which fuse at growth cones (Arantes et al, 2006). Therefore, Ca²⁺ dependent fusion of late endosomes/ lysosomes seems necessary for adding membrane to the developing neurite. Our finding that mature neurons secrete exosomes at the level of dendritic shafts was therefore fundamental to demonstrate that this process is unrelated to lysosomal release occurring at the growth cone but might be part of the physiology of differentiated neurons.

The mode of regulation of exosomal release remains obscure as most published studies use secretion times of several hours. In the case of 8 DIV cortical neurons, we have previously shown that depolarisation with 25mM extracellular KCl increases exosome secretion thus

suggesting that this process is regulated by calcium. However our observations were performed using a 3 hours time of depolarisation/ harvest, a time schedule far too long to discriminate between possible effects of depolarisation on endosomal traffic from those on fusion of MVBs to the plasma membrane. Our present results demonstrating a strong increase in exosomal release from mature neurons during a 5 minutes ionomycin treatment is the first to demonstrate that MVB fusion inside neurons is regulated by calcium.

In hippocampal or hypoglossal neurones MVBs are relatively rare and mainly found within the dendritic shaft but rarely inside spines (Cooney et al, 2002, Rind et al, 2005). In the case of hypoglossal motoneurons, Rind et al noticed that entry of MVBs inside spines is tightly regulated by neurotrophins.

By analogy to other cells, one might consider exosomes as a way out to discard proteins. In the cortex and hippocampus, regulation of the number of ionotropic glutamate receptors expressed at the pos-synaptic membrane is crucial to modulate efficacy of synapses, a process at work during long term depression and potentiation which underlie memory consolidation (Malinow et al, 2002). It is now well documented that this regulation involves endocytosis and exocytosis from endosomal pools of receptors and thus, degradation must contribute to this equilibrium (Ehlers, 2000). Distal dendrites are devoid of lysosomes. Therefore regulation of the pool of surface synaptic receptors by degradation would need transport of MVBs to proximal dendrites and soma and await a signal back to the synapse. The presence of GluR2 subunits in neuronal exosome underlines exosomal release as a possible mechanism for local elimination of receptors at synapses modified by electrical activity. This hypothesis is reinforced by the fact that increasing glutamatergic activity known to modulate trafficking of synaptic glutamate receptors, enhances secretion of exosomes.

Exosomes have received a lot of attention when it became clear a few years ago that they allow intercellular transfer of endogenous proteins as in the case of class II proteins passing between dendritic cells of the immune system. MicroRNAs and mRNAs can also be packaged into exosomes and several recent publications have reported that exosomal mRNA can be translated by receiving cells (Valadi et al, 2007). This demonstrates that the intraluminal content of exosomes is released into the cytosol through fusion of the exosomal membrane with the plasma membrane or with endosomal membranes of the receiving cell. Exosomes might also shuttle infectious agents as the scrapie form of the Prion protein, which is secreted by infected cells by way of exosomes and remain infectious under this form. This has led to the hypothesis that the infectious agents might be propagated from the periphery to the brain by way of transsynaptic passage. Our present study of the release of exosomes from

differentiated neurons further supports this hypothesis, which awaits the demonstration of a transynaptic passage of exosomes.

Some proteins are known to cross synapses. Among them is tetanus toxin (TeTX), which is endocytosed at the neuromuscular junction, retrogradely transported back to the soma inside endosomes and transferred to presynaptic terminals of afferent inhibitory neurons by a mechanism which remains unclear. Once inside inhibitory neurons the toxin enters the cytosol and blocks synaptic transmission by cleaving synaptobrevin of the SNARE complex (Schiavo et al, 1992). This results in a loss of spinal inhibitory control of motoneuron activity leading to spastic paralysis. TeTX is made of a heavy chain linked by a single disulfide bond to a light chain, which acts as a zinc-dependent endopeptidase. The N-terminal half of the heavy chain allows the translocation of the protease from the lumen of endosomes into the cytosol, while the C-terminal function is necessary for binding and endocytosis (Shapiro et al, 1997, Roux et al, 2005). This portion of the heavy chain fused to enzymes or GFP retains the capacity of the intact toxin to cross synapses and has been used to label circuits in the central nervous system (Coen et al, 1996). Using immunogold labelling we found that GFP-TTC was endocytosed by cortical neurons and localised inside MVBs in good agreement with the results of Schiavo and collaborators (Schiavo et al, 1992). Our finding that GFP-TTC released into the extracellular milieu is bound to exosomes confirms that fusion of MVBs to the plasma membrane allows exosome secretion by neurons. Also the demonstration that TeTX, which is capable of crossing synapses is secreted through the exosomal pathway suggests a possible mechanism of transynaptic passage from the periphery to the CNS. TeTX bound to exosomes could be released by motoneurons in the vicinity of afferent inhibitory synapses and endocytosed pre-synaptically. Once inside endosomes exosomes could undergo backfusion with the limiting membrane of endosomes, as reported for intraluminal vesicles of MVBs, thereby releasing the toxin into the cytosol. In this scenario, TeTX would hijack a transynaptic shuttle used endogenously in the nervous system. This hypothesis awaits formal proof of exosome reuptake by receiving neurons or astrocytes.

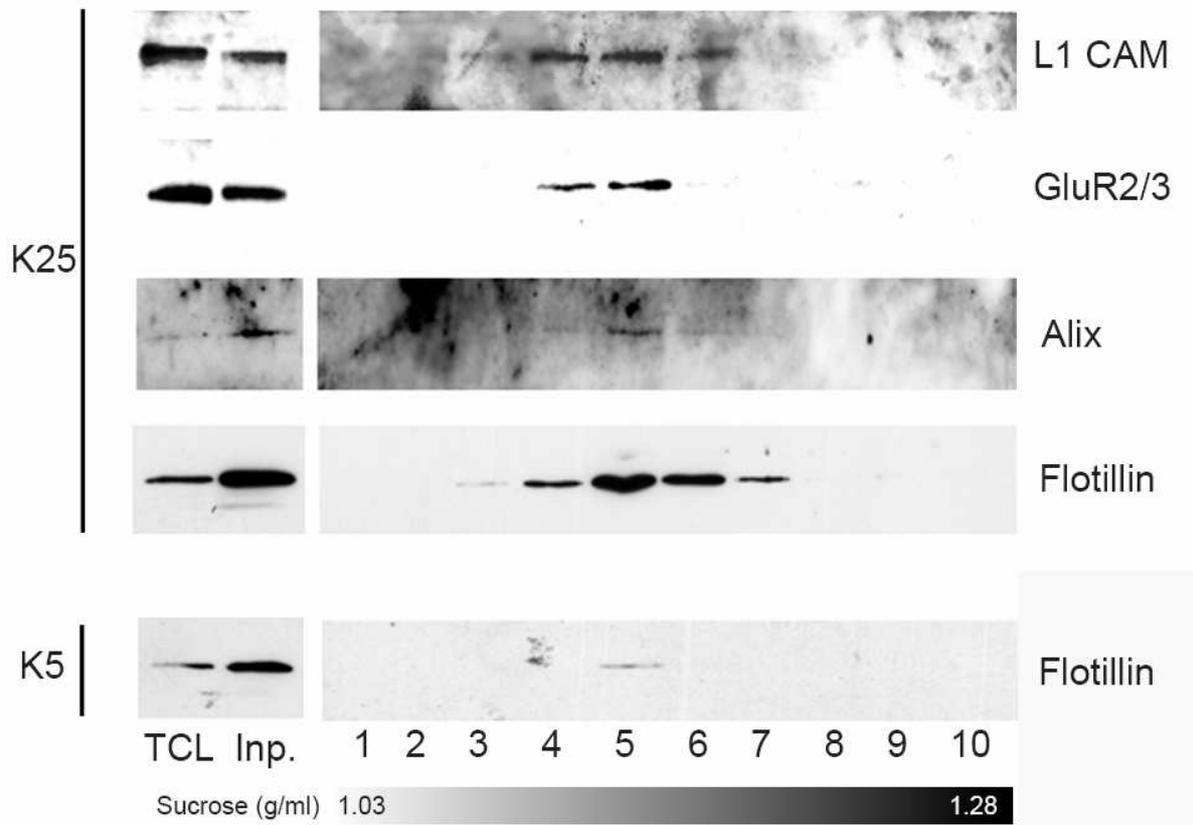


Figure 1. Mature neurons secrete exosomes.

15DIV cortical neurons were incubated 3h in K25 medium and vesicles harvested from $24 \cdot 10^6$ neurons were pelleted at 100 000g. The vesicles were then separated on a continuous sucrose gradient. One ml fractions were collected and analysed by western blot using anti Flotillin, Alix, GluR2/3 and L1 antibodies.

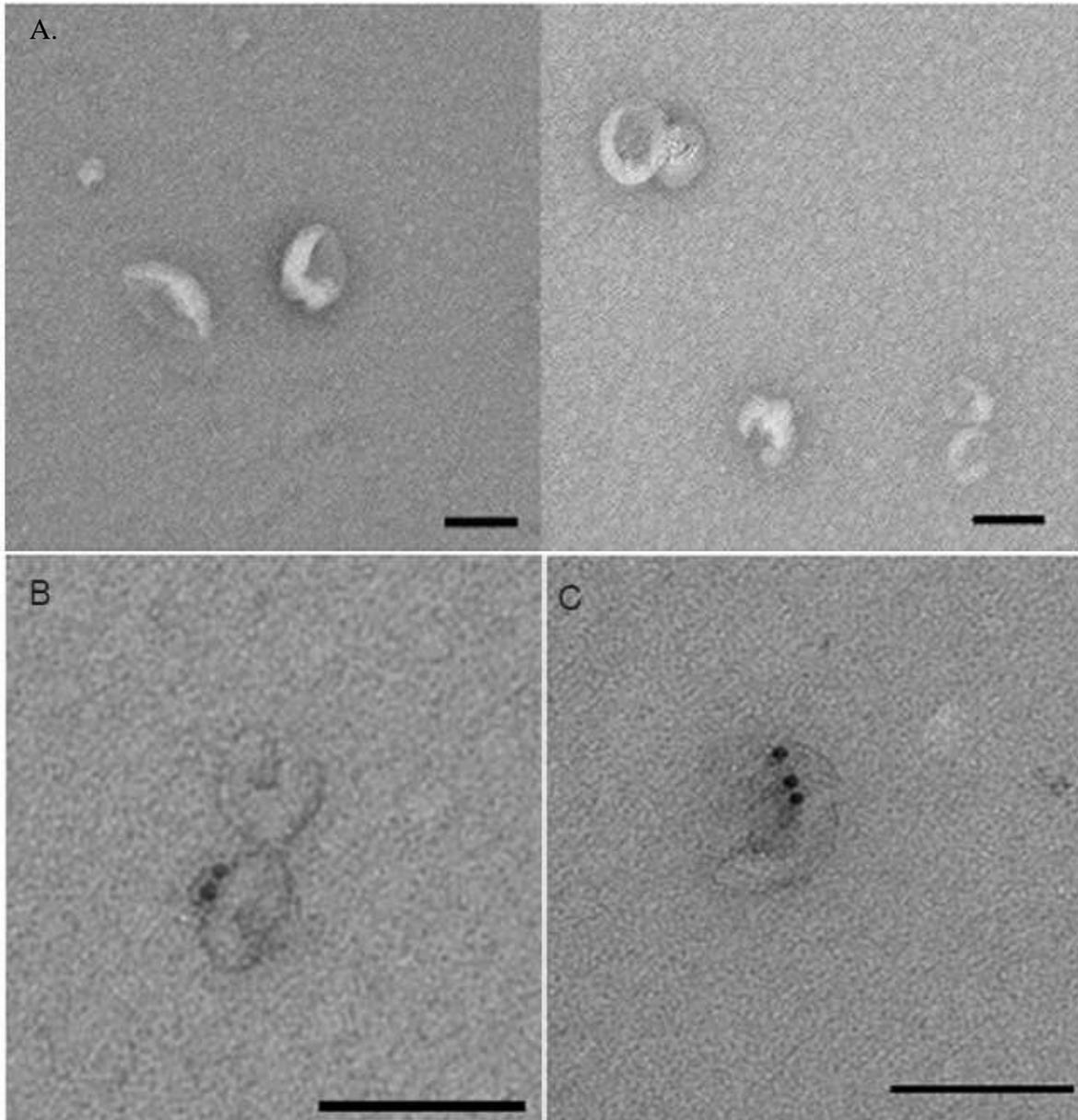


Figure 2: Exosomes are released by 15DIV primary cortical neurons.

A. Electron microscopy examination of vesicles secreted by 15DIV cortical neurons during 5 minutes and pelleted at 100 000g (bar: 100nm).

B. and C. Immunogold of the same preparation using anti-L1 CAM (**B**) and anti-GluR2 (**C**) antibodies.

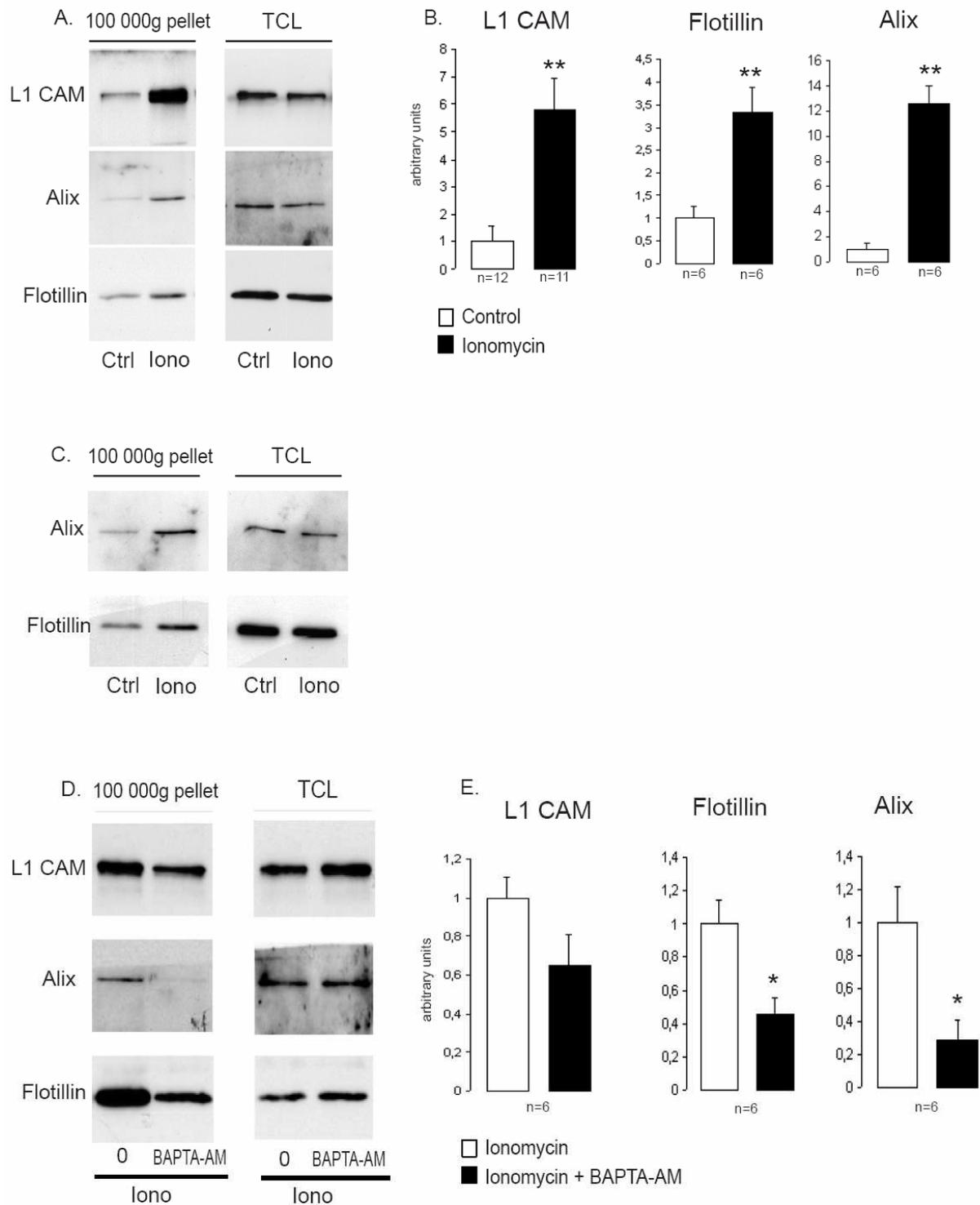


Figure 3: Exosomal secretion is regulated by calcium.

A. Cortical neurons were incubated for 5 minutes in control medium (containing 5mM potassium) or in fresh medium containing 2 μ M Ionomycin. Exosomes released during the 5 min were pelleted and analysed by western-blot using anti-Flotillin, Alix and L1 antibodies (TCL: Total cell lysates)

B. Flotillin, Alix and L1 signals intensity were quantified by densitometry (Wilcoxon test, * : 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01).

C. Hippocampal neurons were incubated for 5 minutes in control medium (containing 5mM potassium) or in fresh medium containing 2 μ M Ionomycin. Exosomes released during the 5 min were pelleted and analysed by western-blot using anti-Flotillin and anti-Alix antibodies (TCL: Total cell lysates)

D. Cortical neurons were incubated for 5 minutes in fresh medium containing 2 μ M Ionomycin, with or without pre-incubating 15 minutes with 50 μ M BAPTA-AM. Exosomes released during the 5 min were pelleted and analysed by western-blot using anti-Flotillin and anti-Alix and L1 antibodies.

E. Flotillin, Alix and L1 signals intensity were quantified by densitometry (Wilcoxon test, * : 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01).

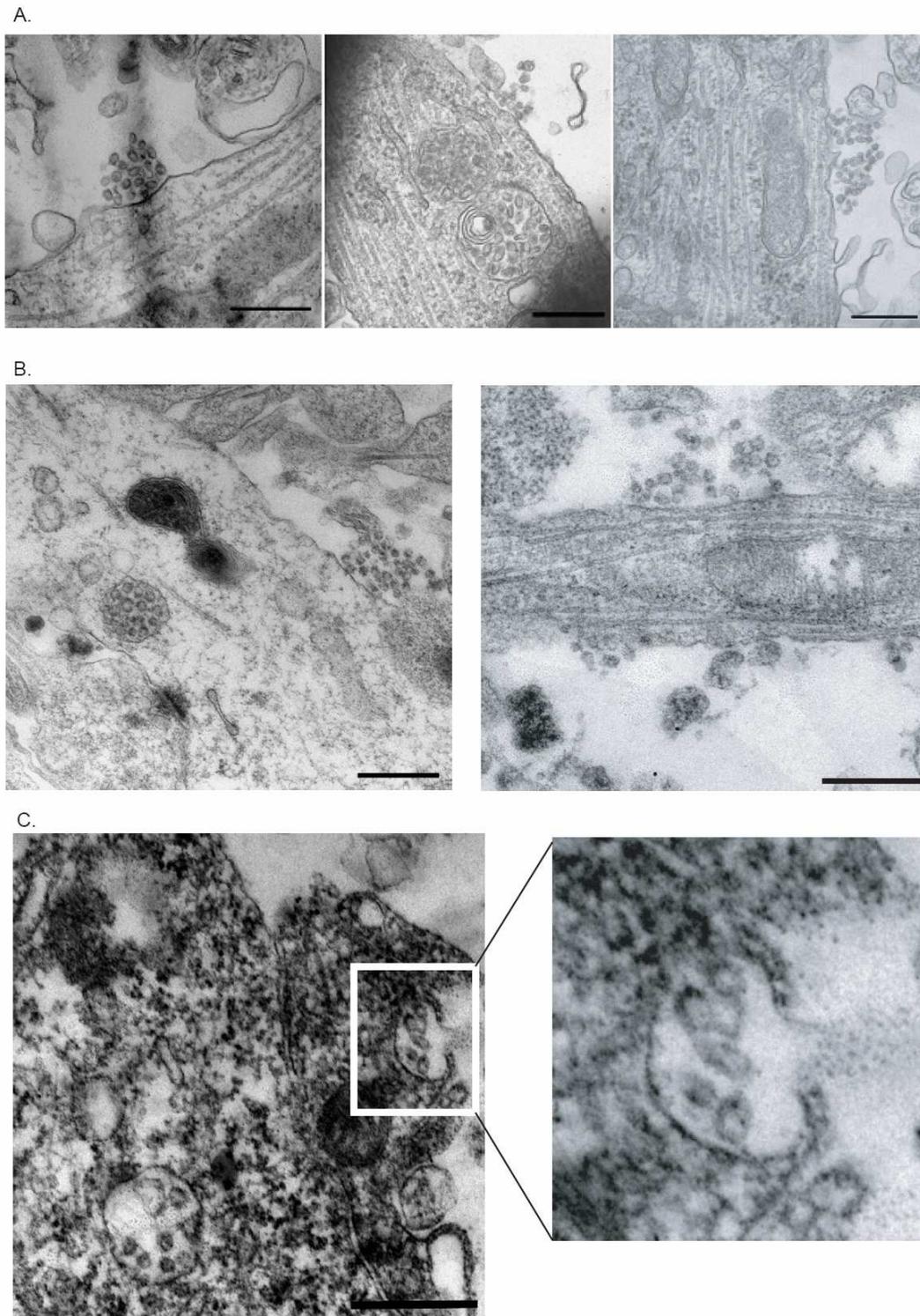


Figure 4. Packets of exosomes are released by cortical neurons in culture.

A. Electron microscopy of 8 DIV cortical neurons in culture shows extracellular packets of vesicles having the size and shape of MVB intraluminal vesicles which are loosely associated with the plasma membrane.

B. The same kind of pictures can be seen in 15 DIV cultures of cortical neurons. (Bar: 500nm).

C. Figure of exocytosis which could represent fusion of MVB leading to the release of exosomes.

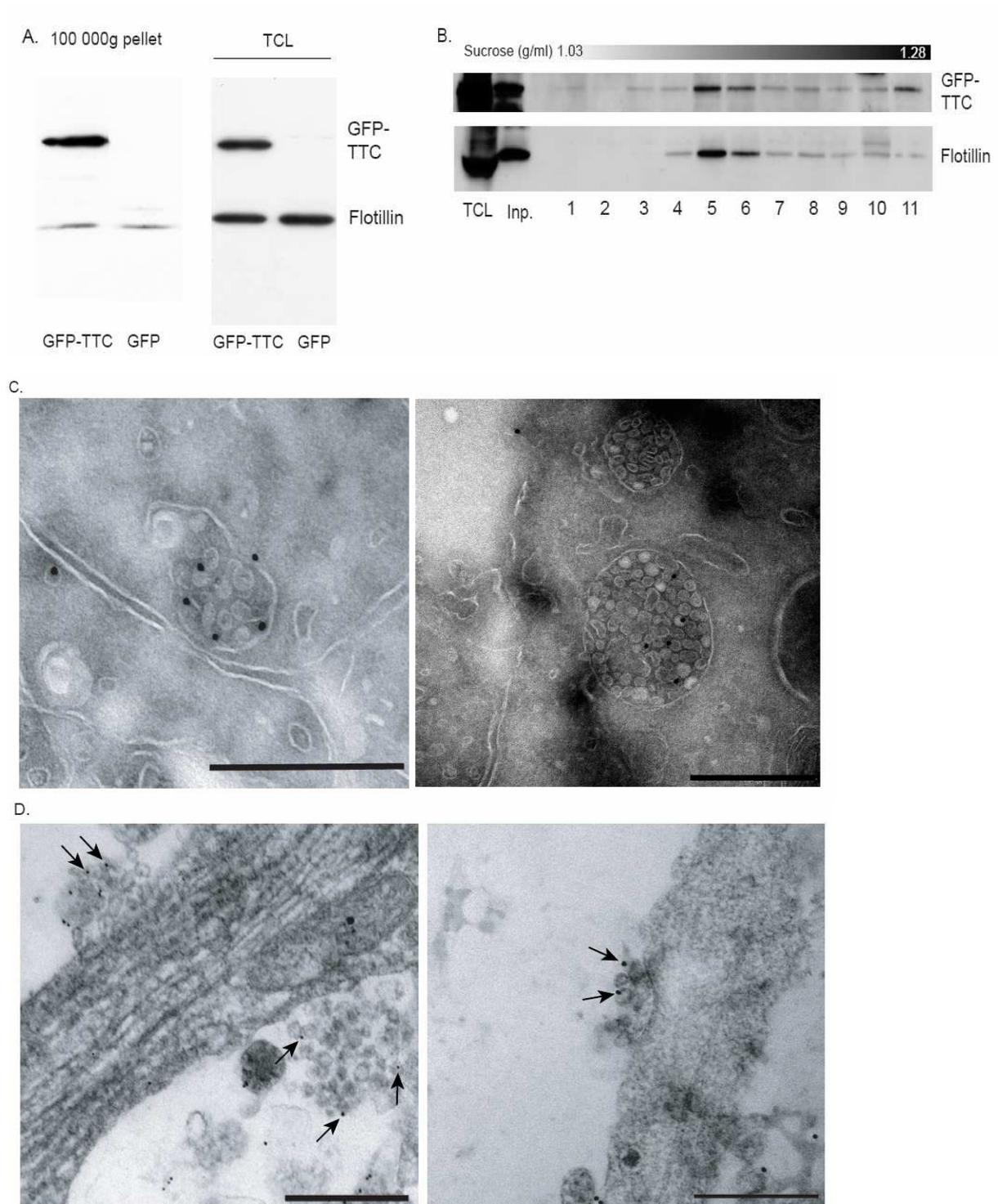


Figure 5. GFP-TTC is secreted in association with neuronal exosomes.

A. Cortical neurons were incubated 1h at 37°C with GFP-TTC or GFP (36nM), before extensive washing. Exosomes secreted for 5 minutes were pelleted by 100kg centrifugation and analysed by western blot using anti GFP and anti flotillin antibodies.

B. Cortical neurons were incubated 1h with GFP-TTC, extensively washed and incubated 2h in K25 medium. Exosomes were pelleted and purified on sucrose density gradient. Fractions were collected and analysed by western blot using anti GFP and anti Flotillin antibodies.

C. Cortical neurons in culture were incubated overnight with GFP-TTC washed extensively and processed for cryosections. GFP was detected using an anti-GFP and protein A coupled to gold bead.

D. Cortical neurons pre-incubated 1h with GFP-TTC were fixed and labelled with GFP antibodies and Protein A coupled to gold before inclusion. Sections were prepared and examined by EM. Arrows show GFP labelling on exosomes closed to plasma membrane (bar: 500nm).

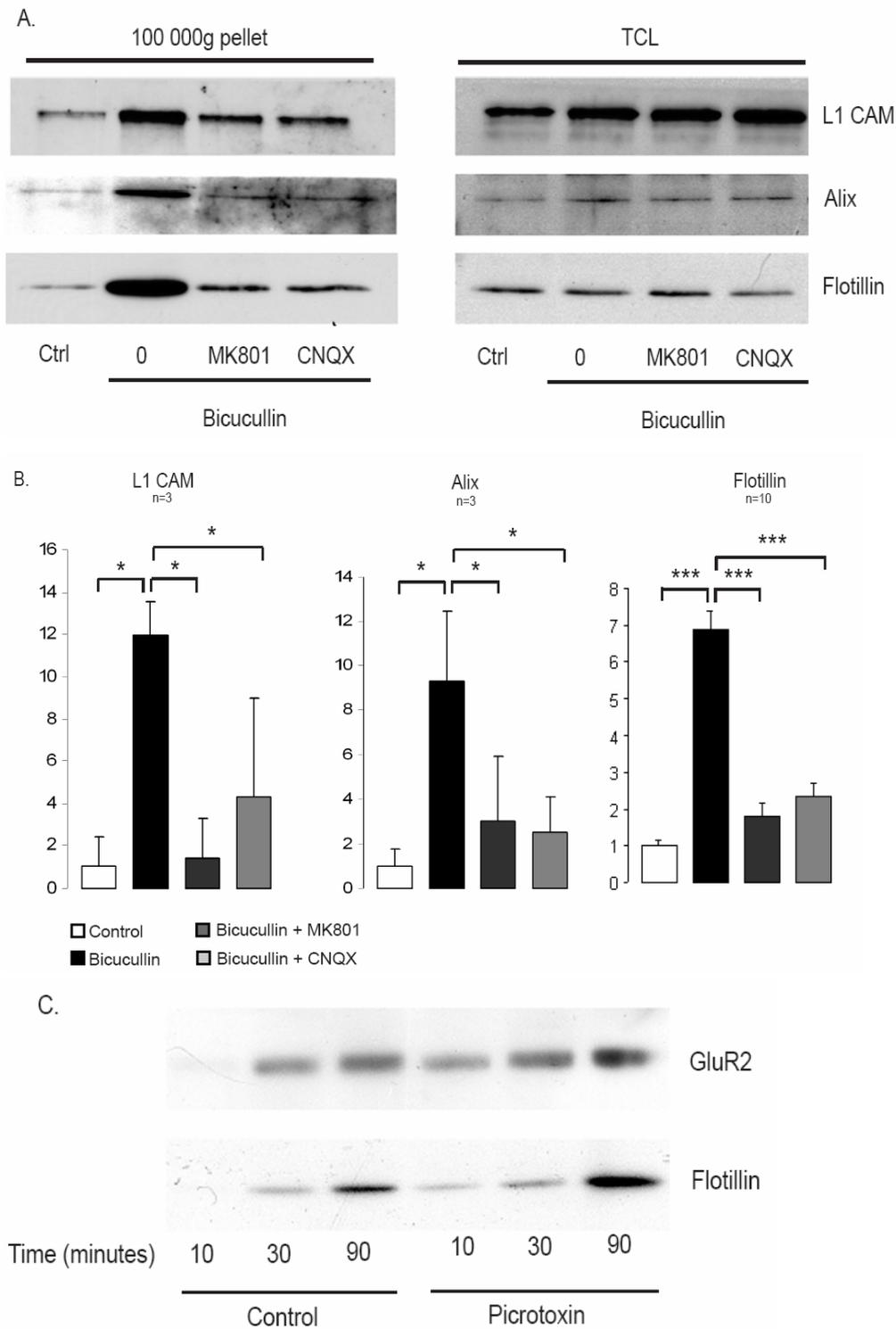


Figure 6. Exosomal release is regulated by glutamatergic synaptic activity.

A. Exosomes from 15DIV cortical neurons were harvested during 10 minutes incubation in K5 medium. 40µM bicucullin, 100µM CNQX or 1µM MK801 were added during the indicated times of harvest. Exosomes were pelleted at 100 000g and analysed by western blot using anti Flotillin, L1 and Alix antibodies.

B. Flotillin, L1 and Alix immunoreactivities were quantified (ANOVA test followed by Neuman Keuls post-hoc comparisons, * : 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01).

C. Exosomes were harvested during 10, 30 and 120 min from 15DIV cortical neurons cultured in K5 medium. 40µM picrotoxin was added during the indicated times of harvest. Exosomes were pelleted at 100 000g and analysed by western blot using anti Flotillin and GluR2 antibodies.

Article 2: La sécrétion des exosomes par les neurones matures en culture est régulée par l'activité synaptique glutamatergique

En 2006, nous avons montré que les neurones corticaux en développement (8 jours en culture) sécrètent des exosomes. Les exosomes neuronaux contiennent des marqueurs exosomaux classiques, comme Alix, la flotilline et tsg101, mais aussi des protéines spécifiques comme la molécule d'adhésion neuronale L1-CAM, les sous-unités des récepteurs AMPA au glutamate GluR2/3, et la protéine du prion endogène PrPc. Ces résultats ont suggéré que les exosomes pourraient participer à la physiologie normale de la synapse, en échangeant des récepteurs aux neurotransmetteurs entre synapses, mais aussi à la propagation de protéines pathogènes à travers le système nerveux. Dans ce nouveau travail, nous montrons que des neurones corticaux matures (15 jours de culture) et des neurones d'hippocampe matures (21 jours en culture), sécrètent des exosomes. La sécrétion des exosomes par les neurones matures est directement régulée par une entrée de Ca^{2+} , et par l'activation des récepteurs AMPA et NMDA synaptiques. De plus, nous avons constaté que la partie C-terminale de la toxine du tétanos est sécrétée par les neurones en culture en association avec les exosomes.

Résultats

1. La régulation de la sécrétion des exosomes par les neurones matures est régulée par le calcium intracellulaire

Dans un premier temps, nous avons montré que les neurones corticaux matures (15DIV) en culture sécrètent des exosomes. Comme nous l'avons fait précédemment (Fauré et al, 2006), les neurones ont été incubés pendant 3h dans un milieu dépolarisant (K25), afin d'augmenter l'activité neuronale. Les exosomes ont ensuite été purifiés sur gradient continu de sucrose, et l'immunodétection en western-blot avec l'anti-flotilline montre la présence de vésicules flottant à une densité comprise entre 1.09 et 1.15 g/ml, marquées également par Alix, L1 et GluR2/3 (fig. 1). L'augmentation du signal flotilline par rapport à un gradient réalisé à partir d'exosomes de neurones incubés 3h en K5 (milieu non dépolarisant) montre que la dépolarisation membranaire augmente la sécrétion des exosomes, comme ce qui avait été montré pour les neurones en développement (8DIV).

Dans le but de regarder la régulation de l'étape précise de fusion des MVB avec la membrane plasmique, nous avons décidé de réduire le temps de récolte des exosomes à 5 minutes. Nous avons dans un premier temps observé en microscopie électronique les vésicules récoltées dans un culot 100 000g obtenu après une incubation de 5 minutes dans le milieu K5. La préparation montre la présence de vésicules ayant la taille et la forme des exosomes (fig. 2a), pouvant être marquées en immunogold avec un anti-L1 (fig. 2b) et un anti-GluR2 (fig. 2c).

Nous avons trouvé qu'une augmentation du calcium intracellulaire par incubation des neurones avec 2 μ M de ionomycine augmente significativement la sécrétion des exosomes (fig. 3a et b). La pré-incubation des neurones pendant 15 minutes avec le BAPTA-AM qui chélate le calcium intracellulaire annule l'augmentation induite par la ionomycine, confirmant que c'est bien une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui est responsable de l'accroissement de la fusion des MVB avec la membrane plasmique.

2. Figures de sécrétion d'exosomes dans les cultures primaires de neurones corticaux

Des observations en microscopie électronique de cultures de neurones corticaux à 8 et 15 DIV ont montré la présence de paquets d'exosomes apposés à la membrane plasmique (fig. 4a et b). Dans certains cas, nous avons pu faire l'observation de la fusion d'endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique (fig. 4c).

Dans le but de prouver que les exosomes analysés dans nos expériences proviennent bien de compartiments endosomaux neuronaux, nous avons utilisé la partie C-terminal de la toxine du téтанos (TTC) couplée à la GFP (GFP-TTC). Cette protéine a la capacité de se lier spécifiquement aux neurones, et des études ont montré son endocytose et son transport dans les neurones, de façon similaire à la toxine entière (Cohen et al, 1996). Les neurones ont été pré-incubés une heure avec la GFP-TTC ou la GFP, puis les exosomes récoltés pendant 5 minutes ont été analysés en western-blot avec un anti-GFP. La figure 5a montre que la GFP-TTC est présente dans le culot 100 000g, tandis que la GFP ne l'est pas. Les exosomes récoltés ont ensuite été séparés sur gradient de sucrose. La détection de la GFP en western-blot montre que la GFP-TTC flotte à une densité de 1.12g/ml, dans les mêmes fractions que la flotilline (fig. 5b). Ces analyses montrent que la GFP-TTC est sécrétée par les neurones en association avec les exosomes. Des analyses en cryo-microscopie ont confirmé la présence de la GFP-TTC sur les ILV à l'intérieur des endosomes multivésiculaires, ainsi que sur les paquets d'exosomes apposés à la membrane plasmique. Ces résultats montrent que les

paquets de vésicules observés contre la membrane plasmique dans les cultures proviennent bien de compartiments endosomaux neuronaux. Ils sont également la première démonstration qu'une protéine connue pour se propager dans le système nerveux entre les neurones par voie trans-synaptique est associée aux exosomes.

3. La sécrétion des exosomes est régulée par l'activité synaptique glutamatergique

Les neurones corticaux ont été incubés pendant 10 minutes avec la bicuculline, un inhibiteur des récepteurs GABAergiques, afin d'augmenter l'activité des synapses glutamatergiques. Comme montré sur la figure 6 (a et b), une augmentation drastique de la sécrétion exosomale est observable après 10 minutes d'incubation avec la bicuculline. L'addition de CNQX, inhibiteur des récepteurs AMPA, ou de MK801, qui inhibe les récepteurs NMDA, réduit significativement la sécrétion exosomale en présence de bicuculline. Ces résultats montrent qu'il existe une régulation de la sécrétion exosomale par les récepteurs AMPA et NMDA synaptiques. Nous confirmons ces résultats par incubation des neurones corticaux avec la picrotoxine, un autre inhibiteur des récepteurs GABAergiques. Nous constatons sur la figure 6c que la sécrétion de la sous-unité GluR2 des récepteurs au glutamate est également régulée par l'activité synaptique glutamatergique.

Conclusion

Ce travail montre que les neurones corticaux matures sécrètent des exosomes ayant une taille et une forme similaire aux exosomes sécrétés par les neurones corticaux en développement. Ils contiennent les marqueurs exosomaux Alix et flotilline, ainsi que la sous-unité GluR2 des récepteurs au glutamate, et la protéine d'adhésion neuronale L1. La fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique dans les neurones matures est régulée par la concentration en calcium intracellulaire. L'activité synaptique glutamatergique augmente également drastiquement la quantité d'exosomes sécrétés en 10 minutes. Nous avons fait l'observation de figures de fusion d'endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique en microscopie électronique. La détection de la protéine de fusion GFP-TTC dans les exosomes et sur ces figures d'exocytose montre bien qu'il s'agit de vésicules provenant de compartiments endosomaux neuronaux.

Ces expériences montrent que la sécrétion des exosomes par les neurones est augmentée par l'activité synaptique glutamatergique. De plus, nous faisons pour la première

fois la démonstration qu'une protéine connue pour être transférée trans-synaptiquement entre les neurones *in vivo* est sécrétée par voie exosomale.

Résultats supplémentaires

I. Neurones

1. Caractérisation des exosomes par spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

(Collaboration avec Alexei Grichin, Institut Albert Bonniot)

Une partie de ma thèse a été consacrée à la quantification des exosomes neuronaux obtenus après différentes stimulations appliquées aux cultures. Afin de quantifier les exosomes sécrétés par les neurones, nous avons d'abord testé la méthode du Bradford. Les résultats sont les suivants : 6.10^7 neurones sécrètent pendant 3h en K25 environ 1 μ g de protéines, soit 0,02pg de protéines par neurone. En comparaison, des quantifications ont été réalisées de la même façon avec la lignée BHK. Les cellules sont placées 3h dans un milieu frais sans sérum. 12. 10^7 cellules sécrètent 1,75 μ g de protéines totales, soit 0,01pg de protéines par cellule. Mais cette méthode reste insuffisamment sensible lorsqu'il s'agit de détecter des exosomes sécrétés pendant 5 minutes.

La FCS mesure le degré de corrélation des photons émis par l'échantillon. Plus la corrélation entre deux photons est grande, plus ils sont proches dans l'échantillon, donc portés par la même particule en solution. De plus, en fonction du temps de diffusion des photons corrélés dans le détecteur, on peut avoir une idée de la taille des particules, et ainsi déterminer s'il existe plusieurs populations, et en quelles proportions. En 2006, Takamori et al ont caractérisé par FCS des vésicules synaptiques purifiées à partir de cerveaux de rat. En utilisant le colorant lipidique FM 1-43 (*fluorescent molecule*, Invitrogen), qui devient fluorescent lorsqu'il s'insère dans une bicouche lipidique (excitation à 479nm, émission à 598nm), les auteurs ont pu déterminer la taille, la quantité, le volume des vésicules, ainsi que la masse de lipides et de protéines par particule.

Nous avons regardé si cette technique pouvait être appropriée pour la caractérisation des exosomes neuronaux. En outre, cette technique permettrait de quantifier précisément les exosomes, par rapport au western-blot avec lequel nous suivons seulement la sécrétion de marqueurs protéiques. Des neurones corticaux ont été incubés pendant 5 minutes à 37°C dans le milieu K5. Les exosomes sécrétés ont été culottés à 100 000g, repris dans du PBS et placés à 4°C avec 1 μ M de FM1-43. Avec une puissance de laser à 2%, les essais ont révélé la présence d'une population de vésicules d'un diamètre moyen de 87nm. En revanche, le nombre de particules n'a pas pu être évalué avec précision. Le principal problème rencontré lors de ces expériences a été l'agrégation des exosomes, qui génère d'énormes pics de

fluorescence biaisant ainsi les résultats. Ces agrégats d'exosomes ont d'ailleurs été observés en microscopie électronique sur culot 100 000g. Ce problème n'est que légèrement atténué en filtrant l'échantillon juste avant l'expérimentation en FCS. Une idée que nous n'avons pas encore testée serait de reprendre les exosomes dans un milieu sans calcium, afin de limiter les interactions protéiques qui pourraient être Ca^{2+} -dépendantes entre exosomes.

Un autre problème rencontré a été que le nombre total de photons émis n'a pas atteint de plateau au bout de 40 minutes, reflétant que le FM 1-43 continue de s'insérer dans les membranes. Ces résultats sont étonnants, compte tenu des propriétés de la molécule, et par rapport aux travaux de Takamori, qui mesurait la fluorescence émise au bout de quelques secondes après l'ajout des vésicules sur le colorant lipidique. La figure 2B de son article montre que la fluorescence émise est stable dans les 30 premières secondes de mesure. Dans nos expériences, cette augmentation du nombre de coup (photons) par seconde fausse l'évaluation de la quantité de particules. Ce problème pourrait peut-être se corriger en augmentant la concentration du colorant lipidique, afin de saturer plus rapidement les lipides et donc d'atteindre plus rapidement un plateau de fluorescence. Il se pourrait également que la nature des lipides présents dans la bicouche exosomale, riche en phospholipides saturés et en cholestérol, joue un rôle dans le ralentissement de l'insertion du colorant dans les membranes.

Enfin, cette étude a été freinée par la rareté des évènements de corrélation. Il serait nécessaire d'augmenter considérablement la quantité d'exosomes dans l'échantillon afin d'obtenir des mesures plus fiables. Cette étude reste donc inappropriée pour les exosomes neuronaux, compte-tenu de la faible quantité de vésicules sécrétées.

2. Fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique

a) Essais *in situ*

(Collaboration avec Karin Pernet-Gallay, équipe 0, GIN)

Nous avons voulu savoir si la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique se produit *in vivo*. Il est intéressant de noter que jusqu'à présent aucune des études suggérant la présence d'exosomes dans certains fluides biologiques ne montre d'image de la fusion de compartiments endosomaux multivésiculaires avec la membrane des cellules *in situ*.

Notre première approche a été de récupérer l'hippocampe contro-latéral de cerveaux de souris stimulés avec 20mM de kainate pendant 2h. Ces stimulations sont réalisées par

l'équipe d'Antoine Depaulis au GIN. Le kainate est un agoniste des récepteurs au glutamate qui provoque une activation de l'hippocampe du côté stimulé, mais aussi de l'hippocampe contro-latéral. Après stimulation, l'hippocampe est immédiatement fixé dans un mélange PFA 2%-glutaraldéhyde 0,2%, puis préparé pour la microscopie électronique. D'autre part, en collaboration avec Mireille Albrieux de l'équipe 10 au GIN, nous avons stimulé des tranches de cerveau prélevé chez le jeune rat (P16), par 40 μ M de bicuculline ou 100 μ M d'AMPA, afin d'augmenter l'activité glutamatergique. Les tranches ont ensuite été immédiatement fixées par le mélange PFA-glutaraldéhyde, puis l'hippocampe est découpé et la partie CA1 est préparée pour la microscopie électronique.

Nous n'avons pas observé de grappes d'exosomes contre la membrane plasmique comme ce que nous avons détecté dans les cultures primaires. Ceci pourrait s'expliquer par la proximité des cellules dans un tissu par rapport aux cultures primaires. Les exosomes une fois libérés peuvent être repris immédiatement par les cellules environnantes, au contraire des cultures où il existe un plus grand espace intercellulaire. Cependant, nous avons trouvé quelques MVB semblant fusionner avec la membrane plasmique. Au niveau de la zone de fusion, un « halot » gris est très nettement visible. Ce halot est également présent dans les cultures primaires de neurones corticaux (fig. 1), et pourrait correspondre au contenu luminal de l'endosome qui se dissipe dans le milieu extracellulaire.

b) Localisation de l'exocytose des MVB

A la suite de différentes observations à la fois dans les cultures primaires, et les tranches, nous remarquons que les figures d'exocytose apparaissent au niveau de l'arborisation dendritique et du corps cellulaire. Nous avons montré qu'il existe une régulation de la fusion des MVB avec la membrane plasmique par l'activité synaptique glutamatergique. Le fait que nous observions les événements de fusion dans les parties post-synaptiques pourrait refléter une régulation de proximité : l'activation des récepteurs au glutamate post-synaptiques induit une entrée de Ca²⁺ localement, qui induit la fusion de l'endosome multivésiculaire immédiatement sous-jacent.

Dans les tranches de cerveau stimulées à la bicuculline, nous avons remarqué de nombreux MVB présents immédiatement sous la densité post-synaptique (fig. 2). Ceci peut suggérer que la stimulation des récepteurs au glutamate provoque un recrutement à la synapse des MVB normalement présents dans le tronc dendritique, aboutissant ensuite à la fusion des MVB dans l'épine. Ce recrutement pourrait éventuellement fournir la synapse en matériel

protéique et lipidique, comme c'est le cas lors de la fusion des endosomes de recyclage avec la surface de l'épine. Le recrutement des MBV à l'intérieur de l'épine a été montré dans les motoneurones du nerf hypoglosse. Le BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) ou le GDNF (*glial derived neurotrophic factor*) injectés au niveau de la langue chez un rat, sont spécifiquement transportés rétrogradement dans les axones du nerf hypoglosse jusqu'aux dendrites, en association avec la membrane limitante des MVB (Rind et al, 2005). Ces MVB se retrouvent ensuite à l'intérieur des épines, et pourraient participer à la plasticité synaptique.

3. Passage des exosomes entre neurones

a) Fixation des exosomes en surface

Dans les cultures corticales à 15 DIV, nous avons fait l'observation, en microscopie électronique, de vésicules de taille homogène, d'environ 70nm, fixés en chapelets à la surface des cellules (fig. 3). La présence dans la figure 4C d'exosomes fixés à la surface d'un élément pré-synaptique (on aperçoit très nettement les vésicules synaptique et la densité post-synaptique sur la figure) suggère que les exosomes ont la capacité de se fixer aux neurones, et que cela peut se produire à proximité des synapses. Mais la possibilité d'une fixation en surface des cellules gliales n'est pas exclue.

b) Internalisation des exosomes par les neurones

Dans les cultures corticales observées au microscope électronique, nous avons également observé des microvésicules d'environ 60 nm pris dans des puits de clathrine (fig. 4), ce qui suggère que les exosomes pourraient être endocytés dans les cultures primaires. La présence comme sur la figure 4b d'une synapse à proximité montre que les neurones sont capables de réaliser cette endocytose. Des expériences complémentaires sont à présent nécessaires pour vérifier qu'il s'agit bien d'exosomes, en marquant les préparations avec par exemple un anti-CD63.

Au cours de ma thèse, nous avons également abordé le problème du transfert d'exosomes entre neurones par une approche en microscopie à fluorescence. Diverses protéines de fusion ont été construites, constituées d'un marqueur exosomal couplé à une protéine fluorescente. Cette protéine est ensuite transfectée dans les neurones, pour nous permettre de suivre les exosomes et de regarder s'il existe un passage trans-neuronal de la fluorescence. Nous avons fait le choix de co-cultiver deux populations de neurones, une transfectée (AMAXA) avec le marqueur exosomal fluorescent, l'autre avec la mRFP (*monomeric Red Fluorescent Protein*),

un variant de la RFP qui a moins tendance à s'oligomériser que la RFP, et qui possède un pic d'émission (605nm) bien distinct de celui des protéines fluorescentes couplées aux marqueurs exosomaux (GFP ou YFP Venus), ceci dans le but de permettre une distinction optimale des deux signaux. L'objectif de la co-culture est que les neurones « verts » et « rouges » soient connectés par des synapses, afin de regarder si en stimulant l'activité neuronale, des points de fluorescence verte (exosomes) passent dans les neurones marqués en rouge, la mRFP permettant de délimiter les contours d'un neurone potentiellement « receveur ».

Nous nous sommes d'abord intéressés au marqueur exosomal Alix. Lorsqu'Alix est surexprimée dans une culture de neurones granulaires du cervelet, les neurones meurent par apoptose (Trioulier et al, 2004). Cependant, la transfection de mutants d'Alix, comme Alix Δ Alg2 (déléte de son site d'interaction à la protéine Alg2 (*Apoptosis linked gene 2*)), Alix Cter (déléte de sa partie N-terminale) ou Alix Nter (déléte de sa partie C-terminale), n'induit pas la mort des neurones. Nous avons donc dans un premier temps testé si ces mutants d'Alix exprimés dans des lignées cellulaires sont sécrétés dans les exosomes. Nous avons constaté qu'Alix Nter et Alix Δ Alg2 sont sécrétés dans les exosomes des BHK, tandis qu'Alix Cter ne l'est pas. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette dernière construction forme des vacuoles dans la cellule qui retiennent la protéine dans le cytoplasme, et l'empêcheraient d'être envoyée dans les ILV.

Nous avons construit la protéine de fusion Alix Δ Alg2 couplée en N-terminal à la protéine Venus. Venus est un variant de la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) qui est résistant aux pH plus acides, et qui blanchit moins que la YFP normale. Nous avons sous cloné la construction Alix Δ Alg2 dans le vecteur pCS2 qui contient la séquence codante pour Venus. La construction a ensuite été transfectée dans des BHK, afin de tester sa sortie dans les exosomes. En parallèle, nous avons également testé la sécrétion exosomale des protéines de fusion GFP-CD63 (*Green Fluorescent protein*), et GFP-AlixNter, dont les constructions ont été réalisées par Anne-Laure Mahul-Mellier ancienne doctorante du laboratoire. Nous avons constaté que la protéine GFP-CD63 est particulièrement enrichie dans les exosomes. Venus-Alix Δ Alg2 et GFP-Alix Nter sont également retrouvées dans le culot 100 000g, indiquant aussi une sécrétion par voie exosomale de ces deux protéines de fusion.

Afin de suivre le passage des exosomes « fluorescents » entre neurones, nous avons transfecté une population de neurones avec les constructions précédentes, et une autre partie avec la mRFP. Les deux populations de neurones sont ensuiteensemencées et cultivées ensemble. Venus-Alix Δ Alg2 montre un marquage cytosolique, tandis que GFP-CD63

apparaît localisée dans des compartiments intracellulaires regroupés essentiellement autour du noyau pour les plus gros, et également semés dans les neurites. Le principal problème rencontré dans ces expériences est l'oligomérisation de la mRFP, qui rend incertaine la délimitation des prolongements et donc impossible l'analyse de la présence des exosomes marqués en vert dans ces prolongements. La mRFP apparaît donc inappropriée pour nous permettre de détecter le passage d'exosomes entre les neurones.

Outre le problème de l'agrégation de la mRFP, nous avons remarqué beaucoup de débris neuronaux autour des neurones transfectés. Ces débris, qui sont fluorescents, correspondent sans aucun doute à des neurones morts après transfection. Pour nous affranchir de ces débris, nous avons en parallèle construit la protéine de fusion Alix Nter-EOS FP. EOS FP est une protéine fluorescente photoactivable (également appelée PAFP, *photoactivable fluorescent protein*). La protéine a une longueur d'onde d'émission de 516nm (vert). Elle peut être activée par un faisceau à 390nm qui provoque une conversion de la protéine qui émet ensuite de façon irréversible à 581nm (rouge). La protéine EOS FP s'assemble en tétramère, c'est pourquoi nous avons utilisé le variant mEOS FP, qui reste monomérique. Nous avons vérifié qu'après transfection dans une lignée cellulaire, cette protéine est sécrétée par les exosomes. Exprimée dans les cultures primaires de neurones, cette protéine nous permettra de suivre la fluorescence qui proviendra précisément de l'endroit photoactivé.

Afin d'augmenter la concentration en exosomes et ainsi améliorer nos chances de voir leur endocytose par les neurones, nous avons cette fois travaillé avec des exosomes sécrétés par des cellules BHK, transfectées ou non avec la protéine d'adhésion neuronale L1-CAM. Cette construction, transfectée dans les cellules BHK, est sécrétée dans les exosomes (non montré). Les cellules BHK ont été marquées avec le PKH67 (Sigma, Morelli et al, 2004). Ce colorant lipidique devient fluorescent lorsqu'il est inséré dans une bicouche lipidique (excitation à 490nm et émission à 504m). Les exosomes sécrétés pendant une nuit ont été poolés, et incubés 30 minutes à 37°C sur des neurones corticaux à 15DIV. Les cellules sont ensuite fixées et observées au microscope à fluorescence. De nombreux points verts sont visibles sur les neurones. La présence de L1-CAM ne semble pas augmenter ce marquage par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent que les exosomes des cellules BHK sont susceptibles de se fixer sur les neurones corticaux en culture, indépendamment de la présence de la protéine d'adhésion neuronale L1-CAM.

Ces expériences sont aujourd'hui poursuivies par Mathilde Chivet, étudiante qui débute sa thèse au laboratoire. Mathilde teste à présent l'endocytose d'exosomes de cellules N2a (lignée

de neuroblastome de souris) surexprimant la protéine CD63-GFP, par des neurones hippocampiques marqués cette fois avec la protéine mCherry, qui semble donner un marquage rouge parfaitement soluble dans le cytosol.

II. Sécrétion de l'APP et de ses fragments dans les exosomes

Takahashi et al, en 2002, ont montré que le peptide A β 42 est localisé au niveau des endosomes multivésiculaires dans les neurones de l'hippocampe des souris transgéniques APP *swedish*. De plus, Vetrivel en 2004 découvre la présence de la γ -sécrétase dans les endosomes. Ces observations nous ont conduits à émettre l'hypothèse que les exosomes pourraient avoir un rôle dans la sécrétion du peptide amyloïde chez les patients Alzheimer. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la lignée cellulaire BHK dans laquelle nous avons surexprimé transitoirement l'APP et certains de ses mutants.

1. Les BHK sécrètent des exosomes

Des exosomes sécrétés par des BHK pendant une nuit sont purifiés par ultracentrifugation à 100 000g. Le culot obtenu est repris dans du sucrose 0,211M, et déposé à la surface d'un gradient discontinu 0,632M – 1,375M. Après centrifugation, les protéines de chaque fraction sont précipitées et analysées en WB. La répartition des marqueurs exosomaux Alix et Tsg101 montre que des exosomes sont concentrés à l'interface des deux coussins de sucrose (fig. 5). Nous vérifions par cette méthode que les cellules BHK sécrètent des exosomes.

2. Sécrétion de l'APP et de ses fragments C-terminaux

Des cellules BHK ont été transfectées avec l'APP sauvage (wt). Les exosomes sécrétés pendant une nuit ont été récoltés par une ultracentrifugation à 100 000g, puis séparés sur gradient discontinu de sucrose 20-40%. Les fractions des gradients ont été analysées en WB, en utilisant un anticorps dirigé contre la flotilline, pour vérifier la présence des exosomes à l'interface, et un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de l'APP. Cet anticorps reconnaît l'APP entier, et ses fragments C-terminaux (CTF, *C-terminal fragments*), comme C99, issu des clivages par la β et la γ -sécrétases, et C83, obtenu après clivage par l' α et la γ -sécrétases (fig. 6). Dans un lysat de BHK surexprimant le fragment C99, l'anticorps reconnaît deux bandes semblent être C99 pour la plus haute, et C83 pour la plus basse, qui serait le

résultat du clivage du C99 surexprimé par l' α -sécrétase (fig. 7a). La figure montre que l'APP entier colocalise dans le gradient avec le marquage flotilline à l'interface 20-40%. De plus, on retrouve aussi à l'interface deux fragments qui correspondent à ceux observés dans le lysat de BHK surexprimant C99. On peut donc conclure que l'APP et ses fragments C-terminaux C99 et probablement C83 sont sécrétés par les exosomes dans des BHK surexprimant l'APP sauvage. La publication de Vingt-deux et al en 2007 montre la présence de l'APP et de ses fragments C-terminaux dans les MVB et les exosomes d'une lignée de neuroblastome. L'interprétation des résultats dans cette publication est compliquée par le fait qu'ils ont en parallèle bloqué l'acidification des endosomes par la bafilomycine, ce qui empêche la dégradation des protéines par les hydrolases acides des lysosomes. Nos expériences, qui ont été faites en absence de bafilomycine, démontrent que la sécrétion de l'APP et des CTF dans les exosomes est une étape naturelle au trafic de l'APP. De plus, nous avons également récolté les exosomes sécrétés par des neurones corticaux en culture, et nous les avons séparés sur gradient continu de sucrose, puis analysés en western-blot. La détection avec l'anticorps anti-APP C-terminal et l'anti-flotilline révèle que l'APP entier et des fragments C-terminaux sont sécrétés par les neurones corticaux primaires en association avec les exosomes (fig. 8).

Dans les BHK surexprimant l'APP entier, on remarque que le fragment C83 est retrouvé dans le lysat en quantité à peu près équivalente à ce que l'on détecte dans les exosomes, tandis que C99 est lui, très enrichi dans les exosomes. Cela suggère que, à la différence de C83, la très grande majorité de C99 est dirigée vers la voie exosomale. C99 étant le fragment à l'origine de l'A β , sa production dans les endosomes et sa sécrétion par les exosomes suggèrent que les exosomes jouent un rôle dans la production et/ou la sécrétion du peptide amyloïde.

La sécrétion du fragment C99 dans les exosomes pose la question d'une synthèse d'A β exosomale. Lorsque l'on omet les inhibiteurs de protéases dans le tampon servant à reprendre les exosomes avant de les séparer sur gradient de sucrose, le fragment APP disparaît de l'interface, tandis qu'un fragment soluble de taille légèrement inférieure apparaît à la surface du gradient. Ce fragment étant reconnu par l'anticorps 6E10 (non montré), dirigé contre les acides aminés 1 à 17 de l'A β , on peut conclure que le fragment soluble est le sAPP α . Ces résultats suggèrent la présence de la α -sécrétase dans les exosomes des cellules BHK, résultat qui a été confirmé en 2006 par Stoeck et al dans une autre lignée épithéliale. Quant à la présence de la γ -sécrétase, les essais réalisés en western-blot pour rechercher la présénilline-1 ont été négatifs dans nos mains. En revanche, en 2008, Sharples et al ont montré que les

présénillines-1 et 2 sont présentes dans les exosomes dans la lignée CHO surexprimant l'APP *swedish*, ainsi que la β -sécrétase BACE-1. Il y a donc fort à parier qu'il existe une production d'A β à partir du fragment C99 sécrété par la voie exosomale.

3. Les mutations *swedish* et *london* altèrent la sécrétion de l'APP et des CTF dans les exosomes

L'APP *swedish* est un mutant pathogène de l'APP, qui porte les mutations K670N et M671L. Ces acides aminés sont situés juste en amont du site de clivage par la β -sécrétase, et leur mutation favorise l'action de l'enzyme et la production d'A β . L'APP_{swe} a été surexprimé dans des cellules BHK. Les exosomes sécrétés pendant une nuit sont récoltés et séparés sur gradient discontinu de sucrose. Les fractions du gradient sont ensuite analysées en WB avec l'anti-APP C-terminal et l'anti-Flotilline (fig. 7b). On constate que l'APP_{swe} entier et ses fragments C-terminaux ne sont pratiquement plus sécrétés dans les exosomes. Ces résultats montrent que la mutation *swedish* altère la sécrétion de l'APP et des CTF dans les exosomes. Nous les avons reproduits dans d'autres expériences réalisées cette fois à partir d'exosomes récoltés par ultracentrifugation à 100 000g, sans fractionnement supplémentaire sur gradient. Nous avons en parallèle évalué le comportement du mutant *london* de l'APP, qui porte une double mutation I716V V717I (fig. 7c). On constate que dans le cas du mutant *london*, l'APP entier, C99 et C83 sont visibles, mais en quantité nettement plus faible qu'avec la protéine sauvage. Dans le cas de l'APP_{swe}, on ne retrouve toujours aucune forme dans le culot 100 000g, alors que le marquage flotilline témoigne de la présence des exosomes.

Ces expériences montrent que par rapport à la forme sauvage, les deux mutations réduisent la sécrétion exosomale de l'APP entier et aussi des CTF. On sait que la présence de la mutation *swedish* induit une augmentation de la production d'A β (Citron et al, 1992). L'absence des fragments C-terminaux dans les exosomes lors d'une surexpression d'APP_{swe} peut être le reflet de cette augmentation du clivage en peptide amyloïde. Thinakaran et al en 1996, ont montré que l'APP_{swe} est clivé par la β -sécrétase au niveau du Golgi, tandis que l'APP_{wt} est envoyé à la membrane plasmique avant d'être protéolysé dans la voie endocytaire. Ces résultats, en corrélation avec les nôtres, suggèrent un trafic différent entre la forme sauvage ou mutée de l'APP.

Les expériences qui ont montré la présence des sécrétases dans les exosomes suggèrent également qu'il puisse exister au niveau des exosomes un clivage plus efficace de l'APP en A β lorsqu'il est muté, rendant la détection de la forme entière et des fragments intermédiaires (C99 et C83) plus difficile.

4. L'inhibition de la γ -sécrétase augmente la sécrétion des CTF issus de l'APP *swedish*

Afin de tester si l'augmentation du clivage de l'APP_{swe} en A β est responsable de la diminution de sécrétion exosomale de la forme entière et des CTF, l'APP *swedish* a été surexprimé dans les cellules BHK, puis les exosomes sécrétés pendant une nuit en présence ou en absence d'un inhibiteur de la γ -sécrétase, le S2188, ont été récoltés par ultracentrifugation puis analysés en western-blot. En guise de contrôle, des BHK ont été transfectées avec l'APP sauvage et les exosomes récoltés ont été déposés en parallèle. Sur la figure 9a, on voit que l'inhibition de la γ -sécrétase restaure une partie de la sécrétion des fragments C-terminaux à partir de l'APP *swedish*.

D'autre part, nous avons également co-transfecté l'APP sauvage avec le mutant A285V de la préséniline 1 (PS-1), impliqué dans une forme familiale de la maladie d'Alzheimer. Cette forme mutante de préséniline induit une augmentation de la production d'A β dans une lignée cellulaire (HEK, *human embryonic kidney*) qui exprime l'APP_{swe} (Page et al, 2008). L'analyse en western-blot des exosomes récoltés montre une diminution de la sécrétion des CTF (fig. 9b).

Ces résultats montrent que la sécrétion des CTF dans les exosomes est directement liée au clivage de la γ -sécrétase. Les mutants de l'APP *swedish* et *london* qui sont à l'origine d'une plus forte production d'A β , sont d'avantage clivés par en A β que l'APP sauvage. Leurs fragments C-terminaux, qui sont donc plus rapidement métabolisés en amyloïde, sont moins retrouvés dans les exosomes. De même, l'APP sauvage cotransfecté avec la PS-1 mutée serait plus clivé en A β , ce qui se traduit par une diminution de la sécrétion de ses CTF dans les exosomes.

Pour voir si la diminution de la sécrétion des CTF dans les exosomes en présence de la mutation *swedish* est corrélée avec une augmentation de la sécrétion d'A β , nous avons surexprimé l'APP wt, swe, ou un plasmide contrôle dans les BHK. Les exosomes sécrétés pendant une nuit ont été récoltés par ultracentrifugation. Les protéines solubles contenues dans le surnageant de la centrifugation ont été précipitées. Le culot 100 000g ainsi que les protéines solubles contenues dans le surnageant ont été déposées sur une membrane de nitrocellulose pour être analysés en dot-blot avec un anticorps anti-A β 42. En parallèle, une

gamme de peptides synthétiques A β 40 et 42 a été déposée, ainsi que des échantillons des lysats cellulaires (fig. 10). On constate que l'A β 42 est sécrété par les BHK qui surexpriment l'APP, et que la mutation *swe* augmente cette sécrétion. Le peptide est présent dans le surnageant de la centrifugation à 100 000g, mais pas dans le culot, ce qui montre qu'il est sécrété sous forme soluble, non associé aux exosomes. Cette observation peut être en corrélation avec les travaux de Rajendran et al en 2006, qui notent que la présence d'A β 42 qu'ils détectent dans les exosomes concerne environ 1% de l'A β total.

On remarque que le peptide n'est pas détectable dans le lysat cellulaire dans ces conditions. En revanche, nous avons été capable dans d'autres expériences de le détecter dans le lysat par immunoprécipitation avec l'anticorps 6E10 puis immunodétection par western-blot avec l'anti- A β 42.

En conclusion, les fragments C99 et C83 de l'APP sont sécrétés dans les exosomes, et les mutations *swedish* et *london* de l'APP, ou la mutation A285V de la PS-1, diminuent cette sécrétion par la voie exosomale. La diminution de la sécrétion exosomale des CTF à partir de la protéine APP $_{swe}$ est corrélée avec une augmentation de la sécrétion du peptide A β 42 sous forme soluble dans le surnageant des cellules, en dehors de la voie exosomale.

Les formes mutées de l'APP ou de la PS-1 induisent une augmentation de la production d'A β 42, en parallèle d'une diminution de la présence du fragment amyloïdogénique C99. Nos résultats suggèrent que ces mutations induisent une perturbation dans le trafic de l'APP, re-dirigeant le peptide amyloïde vers une autre voie de sécrétion que la voie exosomale. BACE-1 et les PS-1 et 2 étant présentes dans les exosomes (Sharples et al, 2008), on peut également envisager que le clivage de l'APP en A β 42 ait lieu dans les exosomes. La présence de la mutation *swedish*, qui fait que l'APP est plus rapidement métabolisé en amyloïde, affaiblirait ainsi la quantité d'APP entier et de C99 dans les exosomes. De même, la présence d'une préséniline mutée dans les exosomes pourrait diminuer le pool de CTF exosomaux observés à partir de l'APP sauvage.

I. Les neurones sécrètent des exosomes

Découverts il y a environ 25 ans, les exosomes étaient au départ vus comme un moyen pour certaines cellules comme les réticulocytes de se débarrasser de protéines dont elles n'ont plus besoin. Peu à peu, les exosomes ont révélé leur étonnante capacité à échanger des protéines, des lipides, mais aussi des ARN, entre les cellules. Les exosomes représentent aujourd'hui une voie majeure de communication intercellulaire. Ce phénomène est particulièrement décrit entre les cellules du système immunitaire, où les exosomes permettent par exemple la mise en route d'une immunité anti-tumorale.

Les exosomes proviennent de la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique. Cet épisode d'exocytose permet la sécrétion dans le milieu extracellulaire de matériel membranaire spécifiquement sélectionné au niveau des endosomes. Les ILV, et donc les exosomes, sont porteuses de protéines membranaires fonctionnelles capables d'être « traitées » dans une cellule réceptrice et ré-exprimées en surface. Les ARNm contenus dans les exosomes peuvent être traduits dans la cellule réceptrice, qui peut alors exprimer de nouvelles protéines et ainsi changer son phénotype.

Au cours de ma thèse, nous avons découvert que les neurones sécrètent des exosomes. Les exosomes neuronaux rassemblent des caractéristiques similaires aux exosomes des autres types cellulaires. Leur taille est comprise entre 60 et 100nm, leur densité comprise entre 1,12 et 1,14g/ml, et ils renferment des marqueurs exosomaux classiques comme Alix, Tsg101 et la flotilline. Les exosomes neuronaux portent également des protéines plus spécifiques, comme la protéine d'adhésion neuronale L1-CAM, et certaines sous-unités des récepteurs au glutamate comme GluR1 (non publié), et GluR2. La protéine PrPc est également présente dans les exosomes purifiés à partir des cultures primaires de neurones corticaux.

En microscopie électronique, nous avons observé la présence de paquets de vésicules de morphologie comparable à celle des ILV présentes dans les MVB. La plupart des événements de fusion de MVB avec la membrane plasmique se produisent dans les dendrites, et quelques uns au niveau du corps cellulaire. Il pourrait être intéressant de regarder si la qualité des exosomes est la même en fonction du pôle de la cellule d'où ils émergent. Une étude de Van Niel et al en 2001 a montré que les exosomes sécrétés au niveau du pôle apical de cellules épithéliales intestinales ont des caractéristiques différentes des exosomes émanant

du pôle basolatéral : les exosomes apicaux sont homogènes tandis que les exosomes basolatéraux sont plus hétérogènes et s'agrègent entre eux. De plus, la régulation de leur sécrétion est également différente, puisque les exosomes du pôle basolatéral sont davantage sensibles à une sécrétion d'interféron γ (IFN γ), cytokine libérée dans l'organisme en cas d'inflammation. L'IFN γ induit une présentation de molécules du CMH I et II couplée à des peptides antigéniques à la surface basale des cellules épithéliales, qui présentent alors les antigènes aux lymphocytes T. L'IFN γ provoque également une sécrétion d'exosomes au niveau de ce même pôle basal, qui portent les molécules du CMH-peptides. Les neurones étant également des cellules polarisées, il y a une possibilité pour que les exosomes sécrétés au niveau de l'axone, s'ils existent, soient différents de ceux sécrétés par le pôle somato-dendritique, et que la régulation de leur sécrétion suive également deux voies distinctes.

En 2008, Trajkovic et al ont avancé certaines évidences montrant que les exosomes proviendraient d'un pool de MVB particulier indépendant de la voie ESCRT. Cette équipe montre que la génèse des exosomes dans lignée oligodendrocytaire Oli-neu, semble impliquer la voie de synthèse des céramides, car l'utilisation de l'inhibiteur de la sphingomyélinase neutre GW4869 réduit la quantité d'exosomes sécrétés. La déplétion en Tsg101 du complexe ESCRT I par siRNA n'a, elle, pas d'effet. Nous avons testé le GW4869 sur les cultures corticales. Des neurones à 15DIV (*day in vitro*) ont été incubés une nuit avec 10 μ M de GW4869. Les analyses en western-blot avec différents marqueurs exosomaux (Alix, Flotilline) n'ont pas montré une diminution significative de la sécrétion des exosomes pendant des temps courts (5 minutes). Ces résultats, qui ne s'accordent pas avec les travaux de Trajkovic, laissent penser que les voies de génèse des exosomes dans les compartiments endocytaires ne sont pas rigoureusement identiques entre les types cellulaires. Une étude en microscopie électronique pourrait être intéressante pour regarder si les MVB contiennent moins d'ILV dans les neurones traités au GW4869.

Nous avons également regardé si l'inhibition de l'endocytose dans les cultures neuronales pouvait affecter la sécrétion exosomale. Le dynasore est une molécule chimique qui inhibe significativement toutes les voies d'endocytose dynamine-dépendantes (Macia et al, 2006). Le dynasore agit en inhibant la fonction GTPase de la dynamine, qui est nécessaire à la fission entre la vésicule d'endocytose et la membrane plasmique. Macia et al ont montré que l'incubation pendant 30 minutes de cellules HeLa avec 80 μ M de dynasore réduit significativement l'endocytose des récepteurs à la transferrine, de la toxine du choléra et des

particules LDL (*low density lipoprotein*). Nous avons incubé des neurones corticaux en culture une nuit avec 40 μ M de dynasore. Les exosomes sécrétés pendant 5 minutes ont été récoltés et comparés aux exosomes sécrétés par des neurones non traités au dynasore. Aucune différence significative n'a été constatée avec les marqueurs exosomaux testés (flotilline et Alix). Ce résultat peut être expliqué par une compensation des mécanismes d'endocytose par des mécanismes dynamine-indépendants passant par d'autres GTPases, comme cdc42 ou Arf6 (Doherty et al, 2009). La physiologie neuronale reposant sur la voie endocyttaire, on peut envisager que les neurones possèdent des mécanismes de compensation importants à ce niveau.

II. La sécrétion des exosomes neuronaux est régulée

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons montré que la fusion des MVB avec la membrane plasmique dans les cultures primaires de neurones est régulée par le Ca²⁺ intracellulaire. En effet, une entrée de Ca²⁺ après incubation avec la ionomycine augmente en 5 minutes la sécrétion des exosomes. Cette augmentation peut être annulée si l'on pré-incube les neurones avec du BAPTA-AM, qui chélate le Ca²⁺ intracellulaire. Le temps court de récolte des exosomes nous assure ici que l'augmentation de sécrétion exosomale est bien le résultat d'un accroissement de la fréquence de fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique, et non d'une augmentation de l'endocytose. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le Ca²⁺ intracellulaire intervient dans le fonctionnement de la machinerie de fusion des MVB avec la membrane plasmique. La synaptotagmine est une protéine senseur de calcium qui régule l'assemblage des complexes SNARE lors des différents événements de fusion se produisant dans la cellule. Il en existe plusieurs isoformes, chacun impliqué dans un événement de fusion bien spécifique. Il sera indispensable par la suite de déterminer quelles SNARE sont recrutés pour la fusion des MVB avec la membrane plasmique. Savina et al en 2002 ont montré que Rab11 intervient probablement dans le recrutement des SNARE spécifiques à cette fusion. L'équipe regarde la sécrétion exosomale des cellules K562 pendant 24h, ce qui n'assure pas que Rab11 est directement impliquée dans la fusion des MVB avec la membrane plasmique. Rab11 pourrait également intervenir par exemple dans la vésiculation ou le tri des protéines à l'intérieur des endosomes. Mais cet élément pourrait être un point de départ à la découverte des SNARE nécessaires à la sécrétion des exosomes neuronaux, car on sait que les protéines Rab participent à la formation de plateformes de recrutement de la machinerie de fusion membranaire. La v-SNARE Ti-Vamp intervient dans la fusion des

lysosomes avec la membrane plasmique (Rao et al, 2004). La t-SNARE syntaxine 13 semble réguler de son côté la fusion entre les endosomes de recyclage et la membrane plasmique. Il pourrait être intéressant de commencer par tester l'implication éventuelle de ces deux protéines dans le mécanisme de la fusion entre MVB et membrane plasmique.

La ionomycine induit une entrée de Ca^{2+} à la fois dans les éléments pré- et post-synaptiques. L'entrée de calcium pré-synaptique déclenche une libération de glutamate. Or l'activation des récepteurs au glutamate induit une augmentation de l'endocytose des récepteurs AMPA (Ehlers, 2000), et de l'endocytose globale (résultats non publiés). Cette augmentation de l'endocytose n'aurait pas le temps de se refléter en extracellulaire en 5 minutes, car d'après les données de Ehlers en 2000, les GluR de surface endocytés ne sont présents à ce moment là que dans les endosomes précoces, pas encore dans les MVB.

Nous avons également démontré que l'activité synaptique glutamatergique augmente significativement la sécrétion des exosomes neuronaux. En effet, une activation des neurones glutamatergiques par l'ajout de bicuculline dans les cultures accroît fortement la sécrétion des marqueurs exosomaux Alix et flotilline. De plus, une augmentation de la sécrétion de la protéine d'adhésion L1-CAM nous assure qu'il s'agit bien d'exosomes neuronaux. L'inhibition concomitante des récepteurs NMDA par le MK801 réduit la sécrétion d'exosomes neuronaux induite par la bicuculline, ce qui suggère que l'accroissement de sécrétion d'exosomes observée avec la bicuculline passe par l'ouverture des récepteurs NMDA. Dans nos conditions, nous observons également une réduction de la sécrétion des exosomes en présence de bicuculline et d'un inhibiteur des récepteurs AMPA, mais il se pourrait que cette réduction vienne d'une inhibition concomitante des NMDAR dans cette condition. En effet, une inhibition des récepteurs AMPA empêche la dépolarisation post-synaptique nécessaire à l'ouverture des NMDAR en présence de glutamate.

L'implication des récepteurs synaptiques au glutamate dans la sécrétion des exosomes a également été confirmée en utilisant un autre inhibiteur des récepteurs GABAergiques, la picrotoxine.

Nous pouvons supposer que le Ca^{2+} qui entre par les récepteurs NMDA peut permettre l'augmentation de la fusion des MVB avec la membrane plasmique. Nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse dans ces conditions expérimentales puisqu'une chélation du Ca^{2+} en présence de bicuculline annulerait la sortie de glutamate à la synapse. Nous avons

également réalisé des expériences en présence de NMDA ou de glutamate exogène, incubé sur les cultures pendant 5 minutes, afin de confirmer l'implication des récepteurs NMDA dans la sécrétion exosomale. Nous n'avons pas obtenu de résultats suffisamment reproductibles. Cette constatation pourrait provenir d'un éventuel stress induit sur les neurones par le NMDA ou le glutamate apportés de façon exogène. Une entrée massive de Ca^{2+} dans les neurones induit des cascades de signalisation aboutissant éventuellement au déclenchement de la mort des neurones, phénomène appelé excitotoxicité. Il a été montré qu'une activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques conduit préférentiellement à la mort neuronale par opposition à l'activation des récepteurs synaptiques qui permettraient au contraire la survie (Hardingham et al, 2003). Or l'ajout de NMDA exogène dans nos cultures active les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques, au contraire de la stimulation à la bicuculline qui n'active que les récepteurs synaptiques. L'ouverture massive de tous les récepteurs NMDA présents à la surface des neurones lors d'un apport exogène de NMDA pourrait perturber les effets du Ca^{2+} sur la fusion des MVB avec la membrane plasmique, au profit d'autres cascades de signalisation impliqués dans l'excitotoxicité (Forder et al, 2009).

D'autres types de canaux calciques sont susceptibles d'être impliqués dans la régulation de la sécrétion des exosomes. En effet, l'incubation des neurones pendant 30 minutes dans un milieu dépolarisant contenant $5\mu\text{M}$ de Nimodipine (inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants de type L) réduit la sécrétion exosomale (non publié).

III. Quel(s) rôle(s) pour les exosomes neuronaux ?

1. Evacuation de matériel à partir de la synapse

Comme cela semble être le cas pour les réticulocytes, la sécrétion des exosomes par les neurones pourrait représenter pour ces cellules un moyen de pallier au manque de lysosomes. En effet, localement, les épines dendritiques n'ont pas de compartiment de dégradation. Les lysosomes sont seulement présents au niveau du corps cellulaire, impliquant un trafic des endosomes qui doivent remonter jusqu'au soma pour permettre la dégradation du matériel endocyté. Compte-tenu de l'ampleur du trafic endocyttaire nécessaire dans chaque épine, et du nombre d'épines susceptibles d'être monopolisées en même temps dans un neurone, il est facilement concevable que les neurones puissent avoir recours à un moyen plus

simple d'évacuation du matériel superflu, en le sécrétant dans le milieu extracellulaire localement par voie exosomale.

2. Modulation de la transmission synaptique

Par le fait qu'ils portent des récepteurs au glutamate, les exosomes neuronaux pourraient intervenir dans la physiologie des synapses. Les études réalisées sur les cellules dendritiques montrent que les protéines apportées par les exosomes peuvent être ré-exprimées en surface par de nouvelles cellules dendritiques qui endocytent les exosomes, les traitent selon un mécanisme encore mal défini avant de diriger certaines protéines à la membrane plasmique, et les ARNm dans le cytosol où ils seront traduits. L'expression de surface des récepteurs aux neurotransmetteurs, en particulier les récepteurs AMPA au glutamate, contrôle directement l'intensité de la dépolarisation, et donc l'activation, du neurone post-synaptique. Les exosomes neuronaux pourraient participer à la modulation de l'expression des récepteurs de surface en échangeant des protéines entre neurones, ou entre les synapses voisines d'un même neurone, contribuant ainsi à une communication inter-neuronale ou inter-synaptique encore jamais décrite.

L'implication du Ca^{2+} et des récepteurs NMDA synaptiques dans la régulation de la sécrétion des exosomes neuronaux pourrait suggérer qu'il existe une communication inter-synaptique par voie exosomale qui soit modulée par l'activité synaptique elle-même. Une activation des récepteurs NMDA conduit à l'endocytose des récepteurs AMPA (Beattie et al, 2000) et à leur rapide réinsertion en surface (Ehlers, 2000). Les récepteurs NMDA sont impliqués dans le mécanisme de la potentialisation à long terme, qui renforce la transmission d'une synapse stimulée de façon téтанique. On peut imaginer qu'il existe un passage exosomal depuis une synapse potentialisée vers les synapses alentours pour communiquer son état d'activation, en fonction de l'enrichissement en AMPAR, en protéines de signalisation, en ARNm et microARN. Nous avons essayé de regarder s'il existait un enrichissement spécifique en certains types de récepteurs ou en certaines sous-unités des récepteurs, en fonction d'une stimulation des AMPAR ou NMDAR, mais sans succès, sans doute en raison d'une trop faible quantité de matériel.

Il a été montré que le contenu en lipides de l'épine dendritique influence l'intensité de la transmission synaptique, en gérant l'expression de surface des récepteurs NMDA, AMPA et mGluR par leur insertion dans les radeaux lipidiques (Francesconi et al, 2009, et Abulrob et al, 2005). Les exosomes étant très riches en cholestérol et sphingolipides, la réinsertion, ou la

fusion en surface, des zones de membranes apportées par les exosomes, est donc susceptible de modifier considérablement la transmission synaptique de la synapse cible. De plus, la présence de cholestérol à la surface des neurones contribue au maintien des épines dendritiques (Hering et al, 2003). Les exosomes pourraient permettre un apport de lipides aux épines, nécessaires à leur motilité, et sous le contrôle de l'activité des synapses adjacentes.

L'hypothèse d'un transfert d'ARN entre neurones par les exosomes est également envisageable. Il faudra dans un premier temps essayer de détecter la présence d'ARN dans les exosomes purifiés à partir des cultures neuronales, puis, le cas échéant, réaliser des hybridations sur des puces *micro-arrays* afin de déterminer quels ARN sont présents, puis en quelle proportion par rapport au cytosol neuronal. Des études ont montré que le pool d'ARNm localisés à proximité des densités post-synaptiques (PSD) est enrichi en certaines populations par rapport aux ARNm totaux répartis dans le neurone. Des ARNm sont transportés puis traduits à proximité de la PSD, en réponse à une activation de la synapse (Suzuki et al, 2007), comme par exemple l'ARNm de la CamKII (calmoduline kinase II), une enzyme qui participe à l'établissement de la LTP (Havik et al, 2003). Il serait intéressant de comparer le profil des ARNm présents dans les exosomes à celui des ARNm présents vers la PSD, et ce, en fonction de l'activité des récepteurs synaptiques au glutamate. Les exosomes pourraient servir à enrichir certaines synapses en ARNm, en réponse à une stimulation. La traduction des ARNm exosomaux dans des neurones receveurs pourra être testée en utilisant le même principe que Valadi et al (2008) : des exosomes sécrétés par des neurones de souris ou une lignée humaine pourraient être déposés sur des neurones de rat, et l'expression de leurs protéines vérifiée dans les neurones receveurs.

Les microARN exosomaux, comme dans le cas des mastocytes, ont également un potentiel extrêmement intéressant. En effet, des microARN transférés par voie exosomale pourraient réguler négativement l'expression de certaines protéines dans les synapses, et ainsi modifier leur activité. Il a été montré que certains microARN sont impliqués dans le développement des épines dendritiques. Par exemple, le microARN miR-134 régule négativement la taille des épines dendritiques sur des neurones d'hippocampe en culture en inhibant la traduction de la protéine LimK, une protéine kinase impliquée dans la morphologie des épines (Schratt et al, 2006). Récemment, Siegel et al ont décrit le microARN miR-138, présent dans les épines dendritiques, qui contribue à diminuer leur taille et influence également négativement l'expression de surface des récepteurs AMPA, affectant ainsi la

transmission synaptique (Siegel et al, 2009). Un transfert de ce genre de microARN par voie exosomal pourrait contribuer sensiblement à modifier la taille et l'efficacité des synapses.

Une étude de Gibbins et al publiée récemment a montré qu'en plus des microARN, les exosomes contiennent également certaines protéines du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) comme GW182, suggérant qu'une partie au moins de la machinerie nécessaire au *silencing* des ARNm est présente dans les exosomes et susceptible d'être échangée entre cellules (Gibbins et al, 2009).

Par un apport de matériel membranaire à la fois protéique, nucléique et lipidique, les exosomes pourraient contribuer à moduler la plasticité des synapses, participer à leur potentialisation, et ainsi influencer les mécanismes de mémorisation neuronale.

3. Propagation de messages pathogènes à travers l'organisme

a) Propagation du Prion

Durant ces 6 dernières années, de plus en plus d'évidences ont émergé sur la présence des protéines PrP^c et PrP^{sc} dans les exosomes sécrétés par diverses lignées. Février et al en 2004 démontrent que les exosomes porteurs de la protéine PrP^{sc} sont infectieux car ils induisent la conversion de la PrP^c cellulaire en scrapie dans une lignée cellulaire en culture, et la mort des souris auxquelles ils ont été injectés suite à des désordres neurologiques. Les exosomes semblent donc être un, sinon le moyen de propagation de l'infection dans l'organisme, éventuellement de la périphérie au SNC, puis à l'intérieur même du SNC. Il est intéressant de noter qu'en 1992, une étude de Scott et al a montré que la protéine PrP^{sc} injectée dans la rétine remonte trans-synaptiquement dans tout le circuit visuel, depuis le nerf optique jusqu'au cortex visuel. Cette étude, associée au travail de Février et al six ans plus tard, pourrait signifier que les exosomes ont la capacité de transférer des protéines de façon trans-synaptique entre les neurones, et que dans certains cas, ce passage trans-synaptique serait utilisé par des protéines pathogènes pour se propager dans le SNC.

L'infection par le prion se fait en général par voie sanguine ou digestive, or ses manifestations sont visibles au niveau des neurones du système nerveux central. Il y a donc un transfert de la protéine PrP^{sc} depuis la périphérie vers le SNC. La propagation de la protéine pathogène depuis la périphérie vers le SNC pourrait se produire soit à partir du système nerveux périphérique, par exemple au niveau de la jonction neuromusculaire, soit directement à partir du flux sanguin directement vers le SNC, ce qui nécessiterait un passage de la protéine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Le passage d'exosomes à travers la

BHE a été mis en évidence lors de la purification d'exosomes dérivés de tumeurs cérébrales dans le plasma sanguin des patients (Graner et al, 2009). Le passage d'exosomes à travers la barrière hémato-encéphalique pourrait dans ce cas expliquer l'apparition des métastases de tumeurs cérébrales en dehors du SNC alors que les cellules tumorales n'ont pas franchi cette barrière. En effet, les exosomes sont porteurs de protéines membranaires oncogènes, comme le récepteur tronqué à l'EGF EGFRvIII. Des exosomes de tumeur cérébrale porteurs de cette oncoprotéine sont capables d'être repris par d'autres cellules tumorales et de l'y transférer, accroissant par conséquent la division cellulaire et donc l'agressivité de la tumeur (Al-Nedawi et al, 2008).

Les travaux réalisés sur le rôle des radeaux lipidiques dans l'infection par le scrapie ont montré que la protéine PrPc doit être ancrée dans ces domaines pour être convertie (Chesebro et al, 2005). De plus, la conversion de la PrPc est favorisée par l'insertion de la forme scrapie dans la même membrane de façon contigüe (Baron et al, 2002). Enfin, il semblerait que la protéine scrapie est plus infectieuse lorsqu'elle est apportée en association avec des microvésicules que sous forme purifiée (Baron et al, 2006). Ces résultats suggèrent que la PrPsc entre dans le SNC en association avec des exosomes, qui pourraient fusionner avec la membrane plasmique des neurones, ou être endocytés, puis ré-exprimés à la membrane après fusion des endosomes avec la membrane plasmique avant de permettre la conversion du PrPc en PrPsc.

Une étude récente de Gousset et al suggère que la protéine PrPsc pourrait également utiliser les nanotubes pour se propager depuis la périphérie vers le SCN, puis entre les neurones du SNC. Les nanotubes sont de fins prolongements de membrane cellulaire qui forment un pont entre deux cellules. En 2004, Rustom et al observent la formation de ces « tunnels » entre des cellules PC12 (*pheochromocytoma cells*) en culture par videomicroscopie. Les nanotubes émergent d'une cellule sous la forme d'un filopode, qui croît en direction d'une autre cellule sans adhérer au substrat, puis établit une connexion avec sa membrane plasmique. Ce phénomène dépendrait de l'activité du réseau d'actine. L'équipe de Rustom observe également le passage unidirectionnel d'objets solubles, tubulaires et vésiculaires dans ces tunnels, dont certains sont marqués par un *lyso-tracker*. L'existence des nanotubes a ensuite été montrée *in vivo* chez la souris, entre des cellules dendritiques présentes dans le stroma de la cornée (Chinery et al, 2008). L'équipe de Gousset en 2009 observe le passage de vésicules portant la protéine PrPc et PrPsc couplées à deux fluorochromes entre des cellules CAD (lignée neuronale catécholaminergique de souris). Ces

travaux suggèrent que les nanotubes peuvent représenter un moyen de propagation du prion entre les cellules. Face aux travaux de Février et al en 2004, qui montrent le transfert de la PrP^{sc} entre cellules par voie exosomale, on peut penser qu'il existe plusieurs voies de propagation de l'infection, dont les exosomes font partie.

b) Maladie d'Alzheimer

La découverte de l'existence des exosomes neuronaux ouvre également des portes vers une meilleure compréhension de la propagation de la maladie d'Alzheimer dans le SNC. Les travaux de Braak et al en 1998 ont montré que la séquence des neurones touchés dans le cerveau des patients Alzheimer varie peu entre patients, ce qui montre que la dégénérescence n'apparaît pas au hasard dans le cerveau, mais touche des zones bien particulières. L'hypothèse de la « dégénération en réseau » a émergé des années plus tard grâce à l'apparition de techniques d'imagerie médicale comme l'IRM fonctionnel (imagerie par résonance magnétique). Cette hypothèse suggère que les aires qui dégèrent dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, les démences fronto-temporales, les démences sémantiques ou certaines aphasies, sont liées fonctionnellement entre elles. La dégénérescence toucherait des réseaux neuronaux ayant un niveau d'activité basale soutenu, mobilisés aussi bien au repos que lors de l'exécution de diverses tâches cognitives (Seeley et al, 2009). Ces réseaux sont distincts en fonction de la pathologie. Dans la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence des aires limbiques précède la dégénérescence des aires para- limbiques, qui précède elle-même la dégénérescence des aires corticales associées. Ce « trajet » suivi par la dégénérescence est tout à fait en corrélation avec la succession des symptômes, depuis les défauts de mémoire jusqu'à la démence. Il pourrait exister un « signal » de survie qui transite synaptiquement entre les neurones connectés au sein d'un même réseau, et lorsqu'une partie du réseau dégère, le reste du réseau s'en trouve ensuite lui aussi affecté. Les exosomes pourraient représenter le véhicule par lequel certains facteurs seraient propagés entre deux neurones connectés synaptiquement, et assureraient la survie de l'ensemble des neurones connectés en un réseau.

Les noyaux corticaux ont une importante activité de base, qui reste soutenue au repos comme lors de l'exécution de tâches cognitives. Cette activité de base élevée pourrait être responsable de la plus grande vulnérabilité de ces zones aux dépôts d'A β . En effet, en 2003, Kamenetz et al ont montré que l'activité neuronale augmente le clivage de l'APP en A β , et que ce peptide, en retour, exerce un rétrocontrôle négatif et diminue la transmission

synaptique. *In vivo*, l'activité synaptique augmente la présence d'A β dans le liquide interstitiel (Cirrito et al, 2005). L'activité neuronale semble donc directement influencer la sécrétion d'A β . Les noyaux corticaux ayant une activité plus soutenue que les aires autour, seraient donc susceptibles de produire d'avantage de peptide amyloïde (Buckner et al, 2009). Or nous savons aujourd'hui que la sécrétion des exosomes est elle-aussi régulée par l'activité neuronale. En se référant aux travaux de Rajendran et al (2006) qui montrent qu'une partie de l'A β est sécrété en association avec les exosomes, ou à nos résultats sur la lignée BHK qui mettent en évidence la sécrétion du fragment amyloïdogénique C99 dans les exosomes, il se pourrait que les exosomes contribuent à cette accroissement de la sécrétion du peptide A β dans ces noyaux corticaux où apparaissent les premiers dépôts amyloïdes.

Un des gènes de susceptibilité de la maladie d'Alzheimer est le gène *gapd* qui code pour l'enzyme GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Li et al, 2004). Cette enzyme, qui intervient dans le métabolisme de la glycolyse en transformant le glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate, pourrait également relier l'activité neuronale à la neurodégénérescence. Une augmentation du taux d'ARNm et de protéine GAPDH a été observée juste avant le déclenchement de l'apoptose dans des neurones en culture (Sawa et al, 1997). Or la suppression de la traduction des ARNm de la GAPDH abolit le déclenchement de cette mort neuronale (Ishitani et al, 1996), ce qui montre qu'une augmentation de la présence à la fois de la protéine et de l'ARNm de la GAPDH induit directement l'apoptose de neurones en culture. Des études protéomiques et transcriptomiques réalisées sur les exosomes de différents types cellulaires ont révélé la présence quasi-systématique d'ARNm codant pour la GAPDH (Valadi et al, 2007) et de la protéine (Johnstone et al, 1987, Théry et al, 2009, Krämer-Albers et al, 2007). La corrélation de ces données suggère que les exosomes pourraient être responsable de la propagation de la neurodégénérescence à travers le SNC, en transférant la GAPDH et son ARNm entre les neurones.

Une interaction de la GAPDH avec le peptide A β a en outre été découverte (Verdier et al, 2008). Les auteurs suggèrent que l'A β pourrait déclencher la dégénérescence des neurones dans la maladie d'Alzheimer en séquestrant une enzyme-clé dans le métabolisme énergétique de la cellule, privant ainsi le neurone d'ATP. Mais cette hypothèse n'explique pas l'augmentation de la synthèse de GAPDH qui précède la neurodégénérescence. Il a en outre été montré que la GAPDH jouerait un rôle dans la voie endocytaire, car la surexpression d'un mutant de l'enzyme inactif induit une rétention des protéines endocytées dans les

compartiments précoces (Robbins et al, 1995). Le peptide A β pourrait ainsi séquestrer la GAPDH et provoquer des perturbations du système endo-lysosomal éventuellement fatales pour la cellule.

c) Propagation de neurotoxines

La toxine du tétanos a la capacité particulière de transiter d'un neurone à un autre en passant de façon trans-synaptique rétrograde, selon un mécanisme encore non élucidé. Sa spécificité neuronale et sa propension au passage trans-synaptique nous ont conduits à tester l'hypothèse de sa sécrétion par voie exosomale. En effet, il est possible que la toxine soit libérée par le neurone moteur en association avec des exosomes qui seraient repris localement par les interneurons, dans lesquels la toxine entrerait ensuite en action en clivant la synaptobrevine II. Nous avons montré que la partie C-terminale de la toxine couplée à la GFP est sécrétée par voie exosomale à partir de cultures primaires de neurones corticaux, ce qui laisse penser que la toxine entière utilise effectivement à son avantage une voie physiologique de transfert trans-synaptique de matériel entre les neurones.

Il se peut que dans les expériences ultérieures, nous soyons confrontés à un problème de spécificité du type neuronal. En effet, nous utilisons des neurones corticaux. Or, dans les motoneurons, la toxine semble être envoyée dans des compartiments bien spécifiques qui ne s'acidifient pas, distincts de ceux qui internalisent par exemple la toxine botulique (Montecucco et al, 2004). Cependant, en 1996, Matteoli et al ont montré que sur des neurones d'hippocampe en culture, la toxine entre en suivant le recyclage des vésicules synaptiques, puis passe dans le cytosol et clive la synaptobrevine II. Ces résultats, qui divergent de ceux obtenus dans les neurones moteurs, suggèrent très fortement qu'il existe, en fonction du type neuronal, un comportement totalement différent de la TeNT : soit elle rentre par la voie endocytaire et les *rafts*, et peut être transportée dans le neurone sans que la protéase n'entre en action, comme dans le cas des motoneurons, soit elle suit le recyclage du pool de vésicules synaptiques et aurait ensuite directement accès à la synaptobrevine II, ce qui semble être le cas pour les neurones d'hippocampe. Il sera donc à terme nécessaire de réaliser des cultures de neurones moteurs pour tester la sécrétion exosomale de la toxine entière. Il sera également important de vérifier que la toxine associée aux exosomes peut être reprise par d'autres neurones et cliver la synaptobrevine II des neurones receveurs.

d) Propagation de virus neurotropes

Il est intéressant de noter que beaucoup de virus neurotropes, comme le virus de la poliomyélite (poliovirus, virus à ARN), et les virus à ADN de la varicelle (virus varicelle-zona), ou de l'herpès (Herpes simplex virus), se propagent dans le SNC selon un mode trans-synaptique (Daley et al, 2005, Rostad et al, 1989, Joshi et al, 1995). Or il a été montré que certains rétrovirus utilisent la machinerie cellulaire de génèse des exosomes pour se répandre dans l'organisme. Il n'est pas exclu que cette hypothèse de l'«exosome de Troie» soit également valable pour les virus à ADN. Par exemple, il a été montré que le virus de l'herpès HSP1 utilise les MVB lors de sa génèse (Calistri et al, 2007). Si des virus sont capables de se propager de façon trans-synaptique, on peut faire l'hypothèse qu'ils aient exploité comme les rétrovirus, la voie exosomale pour le faire. Si c'est effectivement le cas, cela sous-entendrait que les exosomes sont capables de passer d'un neurone à l'autre par voie trans-synaptique. Il pourrait donc être intéressant de vérifier si ces virus neurotropes peuvent être sécrétés par l'intermédiaire des exosomes neuronaux.

e) Autres maladies neurodégénératives

Les complexes ESCRT qui sont à l'origine d'une partie au moins de la vésiculation à l'intérieur des endosomes, sont actuellement mis en cause dans un certain nombre de maladies neurodégénératives. Il a été montré que les complexes ESCRT jouent un rôle protecteur contre la neurodégénérescence, en permettant la dégradation lysosomale de matériel en provenance des endosomes, et des autophagosomes. Les autophagosomes correspondent à la séquestration d'une partie du cytoplasme à l'intérieur d'une double membrane. Ces compartiments fusionnent ensuite avec les endosomes tardifs ou les lysosomes pour permettre par exemple la dégradation de compartiments cellulaires endommagés.

Des mutations dans le gène codant pour CHMP2B (ESCRT III) ont été décelées dans plusieurs familles présentant une démence liée à une dégénérescence des neurones situés au niveau du lobe fronto-temporal (DFT, démence fronto-temporale) (Skibinski et al, 2005), ainsi que dans certains cas de sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Parkinson et al, 2006) et de dégénérescence cortico-basale (Van der Zee et al, 2008). Les patients atteints de DFT présentent des troubles du comportement et de la parole, jusqu'à l'aphasie. Dans l'ALS, ce sont les motoneurones qui dégénèrent, aboutissant à une paralysie progressivement fatale. La dégénérescence cortico-basale associe quant à elle une démence à des troubles moteurs. CHMP2B étant exprimée dans de nombreux tissus, rien ne semble expliquer les conséquences

exclusivement neuronales des mutations dans son gène. La localisation de la dégénérescence en fonction des pathologies reste également un mystère.

L'expression du mutant *CHMP2B-intron5* associée à la DFT dans des neurones en culture provoque une diminution drastique de la taille des épines dendritiques (Belly et al, soumis pour publication), suivie par une sévère rétraction des dendrites puis une dégénérescence (Lee et al, 2007). De même, l'extinction de *CHMP4B* dans des neurones corticaux en culture induit également un effondrement de l'arborisation dendritique et une mort neuronale (Lee et al, 2007). Or on sait que la partie C-terminale qui est délétée dans les mutants associés aux DFT interagissent avec l'ATPase SKD1. Les auteurs suggèrent donc qu'il pourrait s'agir d'un problème de désassemblage du complexe ESCRT III, car l'extinction de SKD1 induit le même phénotype que l'expression des mutants.

Lee et al ont également observé l'accumulation de protéines ubiquitinylées et d'autophagosomes dans le cytosol des neurones surexprimant le mutant *CHMP2B-intron5*. Ces caractéristiques histologiques avaient également été mises en évidence dans la maladie de Parkinson et la chorée de Huntington, deux autres maladies neurodégénératives provoquant de sévères atteintes motrices. Or l'évacuation de ces agrégats protéiques et des autophagosomes semble nécessiter la présence de MVB fonctionnels, car l'extinction des protéines Hrs (ESCRT 0), Tsg101 (ESCRT I) et Vps22 (ESCRT II) par siARN dans des neurones en culture induit l'apparition de ces mêmes agrégats de protéines ubiquitinylées et altère la dégradation autophagique (Filimonenko et al, 2007).

La mort des neurones dans ces différentes maladies neurodégénératives semble donc être liée à un défaut d'évacuation des protéines à dégrader résultant d'un dysfonctionnement de la machinerie ESCRT et des MVB. Il pourrait être intéressant de regarder si la sécrétion exosomale est altérée dans les cas où les mutants des CHMP sont exprimés. En effet, les exosomes neuronaux peuvent représenter une voie d'élimination de protéines à laquelle les neurones ont recours pour pallier au manque de lysosomes dans les épines dendritiques. Un défaut de la machinerie ESCRT est susceptible de réduire la sécrétion exosomale des neurones, et donc d'altérer une voie potentielle d'évacuation de matériel aussi bien en provenance des endosomes que des autophagosomes. De plus, un défaut d'évacuation des récepteurs au glutamate, dont nous avons détecté des sous-unités dans les exosomes neuronaux, pourrait affecter la morphologie des épines dendritiques. Le dysfonctionnement de la voie endocytaire résultant de la présence des mutants de *CHMP2B* serait ainsi susceptible

de déclencher localement l'effondrement des épines dendritiques, puis la mise en route du processus dégénératif.

La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques présents dans la substance noire au niveau du mésencéphale. Ces neurones sont responsables du contrôle du circuit moteur, et leur dégénérescence provoque l'apparition de mouvements saccadés des membres, qui deviennent de plus en plus rigides et incontrôlables. Une des caractéristiques histologiques de la maladie de Parkinson est la présence de corps de Lewy, des inclusions d'une dizaine de micromètres de diamètre présents autour du noyau des neurones, et dans les prolongements. Dans ces inclusions, ont été principalement détectées l'ubiquitine et l' α -synucléine, une protéine cytoplasmique associée à la membrane des vésicules synaptiques et impliquée dans la libération de dopamine. Des mutations dans le gène SNCA qui code pour la synucléine ont été découvertes dans certains cas génétiques de Parkinson. Une étude de 2008 révèle que des neurones greffés chez deux patients Parkinsoniens ont progressivement présenté l'apparition de ces inclusions de Lewy, contenant l' α -synucléine (Li et al, 2008). Cette étude décrit pour la première fois le transfert de la pathologie des neurones du patient aux neurones du greffon pourtant sain. En 2008, une étude a montré qu'une partie de l' α -synucléine était sécrétée par les neurones, et que l' α -synucléine extracellulaire pouvait être endocytée par les neurones (Lee et al, 2008). Il serait intéressant de tester la présence de la synucléine dans les exosomes de neurones dopaminergiques. Si c'est le cas, il faudrait par la suite tester l'effet d'exosomes contenant la synucléine sur des neurones receveurs. Ceci pourrait permettre de suggérer une voie de passage de cette protéine pathogène entre les neurones *in situ*.

4. Communication entre cellules gliales et neurones

a) Rôle des exosomes dans la protection des neurones

Un grand nombre de maladies neurodégénératives est relié à une plus forte susceptibilité des neurones matures face à des facteurs toxiques à la fois exogènes et endogènes. Cette sensibilité accrue pourrait être due à un dysfonctionnement des systèmes de protection, comme par exemple la libération d'une chaperonne de la famille des HSP (*heat shock proteins*), Hsp70, dans le milieu extracellulaire des neurones. Une publication d'Ayala et al en 2008 a montré qu'une excitotoxicité induite dans l'hippocampe d'un rat, provoque la libération d'Hsp70 dans l'hippocampe controlatéral. Cette sécrétion semble protéger les

neurones de la toxicité induite par une injection de 4-AP (4-aminopyridine), un bloqueur des canaux K^+ . Une autre étude a révélé qu'une lignée de cellules gliales en culture stressée à 44°C sécrète la protéine Hsp70, et que cette protéine est internalisée par des cellules d'un neuroblastome humain et les rend plus tolérantes à la chaleur ou à l'action de la staurosporine, un déclencheur de l'apoptose (Guzhova et al, 2001). La sécrétion d'Hsp70 par les cellules gliales semble donc jouer un rôle neuroprotecteur.

Plusieurs études ont montré que les cellules gliales sécrètent des exosomes. Durant la première partie de ma thèse, nous avons détecté en spectrométrie de masse la présence de la protéine gliale Glast-1 dans les exosomes récoltés à partir des cultures de neurones corticaux, ce qui suggère que les astrocytes présents dans nos cultures ont la capacité de sécréter des exosomes (Fauré et al, 2006). En 2007, Taylor et al ont montré que les astrocytes en culture sont capables en réponse à un stress, de sécréter des exosomes qui contiennent la protéine Hsp70. Cette découverte suggère que les astrocytes pourraient communiquer des signaux de stress cellulaire aux neurones environnants par la voie exosomale. Nous avons d'ailleurs retrouvé la protéine Hsc70, homologue à Hsp70, dans les exosomes purifiés dans les cultures de neurones corticaux, mais nous ne pouvons pas dire si elle provient des exosomes neuronaux ou astrocytaires (Fauré et al, 2006). Hsc70 serait sécrétée par les cellules de façon constitutive tandis que la libération d'Hsp70 est fortement augmentée lors d'un stress.

Il pourrait être intéressant de purifier des exosomes de cellules gliales ou de neurones stressés, et de les incuber sur d'autres neurones, puis d'examiner leur survie.

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales responsables de la formation de la gaine de myéline dans la substance blanche du système nerveux central. Ils s'enroulent autour de l'axone afin de l'isoler et d'accélérer la propagation de l'influx nerveux. La gaine de myéline est largement composée de sphingolipides, de cholestérol, ainsi que de protéines spécifiques, principalement la PLP (*Proteolipide protein*) et la MBP (*myelin basic protein*). Sa formation met en jeu une communication mutuelle entre les neurones et les oligodendrocytes (Simons et al, 2006). Une étude de Krämer-Albers et al, en 2007, a montré que des oligodendrocytes primaires en culture sécrètent des exosomes qui contiennent, outre le marqueur exosomal Alix, la protéine PLP, ainsi que de nombreuses Hsp. La composition des exosomes d'oligodendrocytes est très proche de celle de la myéline. En effet, ils contiennent deux lipides uniquement présents dans la gaine de myéline, le galactocérobroside et le sulfatide. La croissance de la gaine nécessite un apport considérable de matériel lipidique et protéique. Le ciblage des protéines comme la PLP et la MBP vers la lèvre de l'oligodendrocyte qui

s'enroule autour de l'axone nécessite leur apport, ou celui de leur ARNm, depuis le péricaryon. Ce transport pourrait nécessiter la libération d'exosomes à partir du péricaryon vers la gaine en formation. Il est intéressant de noter que plusieurs études suggèrent l'importance des radeaux lipidiques dans le ciblage des protéines vers la myéline (Taylor et al, 2002, Marta et al, 2003).

L'activité neuronale est importante pour permettre le remodelage lipidique qui se produit au niveau de la gaine en formation (Fitzner et al, 2006). Or la production d'exosomes par les oligodendrocytes est contrôlée par le Ca^{2+} intracellulaire, car une incubation avec la ionomycine pendant 30 à 120 minutes augmente significativement la présence de PLP dans le culot (Krämer-Albers et al, 2007). Dans les oligodendrocytes, l'entrée de Ca^{2+} est régulée par les neurotransmetteurs libérés par les neurones, comme par exemple le glutamate. Il se pourrait que la sécrétion des exosomes oligodendrocytaires soit régulée par l'activité neuronale de la fibre qui régulerait par ce moyen sa propre myélinisation.

Il a été montré qu'une production trop importante de myéline par surexpression de la PLP chez des souris transgéniques induit la dénégérescence à la fois de la gaine et de l'axone (Ip et al, 2006). Les exosomes d'oligodendrocytes pourraient permettre une régulation de la production des composants de la gaine, en évacuant un surplus de PLP. Dans la maladie neurodégénérative appelée syndrome de Pelizaeus-Merzbacher, une mutation dans le gène de la PLP induit une accumulation de la protéine et du cholestérol dans les endosomes (Simons et al, 2002). En condition normale, la PLP est également présente dans les endosomes, et sa relocalisation à la membrane plasmique est induite par l'activité neuronale (Trajkovic et al, 2006). Les exosomes pourraient représenter une voie d'évacuation de cette protéine vers le milieu extracellulaire, où ils seraient ensuite phagocytés par les cellules de la microglie. Une altération de ce système pourrait être à l'origine de pathologies à myéline.

Enfin, il a été remarqué une très forte représentation des protéines de type HSP (hsp70 1A, 1B, 1L, hsp90 α et β , Hsc71) dans les exosomes d'oligodendrocytes, ce qui pourrait témoigner de leur rôle éventuel dans la protection des neurones contre certaines formes de stress, comme cela serait le cas pour les astrocytes.

b) Transfert d'ARN entre cellules gliales et neurones

Il a été mis en évidence que certains ARN situés dans l'axone des neurones auraient pour origine non pas le corps cellulaire du neurone comme supposé au départ, mais les cellules gliales environnantes (Giuditta et al, 2002). En effet, une expérience réalisée sur un

axone géant de calmar isolé du corps cellulaire a révélé l'apparition d'ARN néo-synthétisés ne pouvant provenir que des cellules gliales environnantes. Il existerait un transfert d'ARN entre cellules gliales et axones, fournissant à la terminaison pré-synaptique une partie de son pool de protéines. Il est intéressant de noter que l'étude de Giuditta et al montre que l'apport des ARN dans l'axone est considérablement accru en condition dépolarisante (100mM de potassium dans le milieu extracellulaire). Les auteurs vont même jusqu'à montrer que c'est bien une dépolarisation de la membrane neuronale, et non gliale, qui induit l'augmentation du transfert d'ARN vers l'axone, en réduisant précisément le K^+ dans l'axoplasme. Ce dernier résultat suggère que c'est la libération de neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique qui induit une augmentation du transfert des ARN depuis les cellules gliales vers l'axone. Cette régulation pourrait impliquer les récepteurs aux neurotransmetteurs présents à la surface péri-axonique des cellules gliales. De façon tout à fait intéressante, les récepteurs NMDA sont présents à la surface des cellules gliales et leur inhibition réduit significativement le transfert glio-axonal d'ARN. Il existerait ainsi un système d'expression génique local autour des axones et des terminaisons pré-synaptiques, permis par les cellules gliales environnantes et régulé par l'activité neuronale. Il sera intéressant de regarder si les exosomes des cellules gliales contiennent des ARN et de tester leur potentiel de transfert vers les neurones. L'apport d'ARN au niveau de la terminaison prés-synaptique par cette voie glio-axonale pourrait jouer un rôle important dans la physiologie synaptique encore jamais décrit jusqu'à présent.

Ces dix dernières années, il a été mis en évidence l'existence d'une traduction d'ARNm localement dans la terminaison axonale, ce qui contrecarre d'anciennes études qui avaient observé le contraire. *In vivo*, l'infiltration de siARN dans l'axoplasme d'un neurone du nerf sciatique isolé de son corps cellulaire engendre une déplétion en tubuline dans la terminaison nerveuse, ce qui signifie que certains ARNm peuvent être traduits dans l'axone pour lui fournir notamment des protéines du cytosquelette (Murashov et al, 2007). De plus, l'inhibition de la synthèse protéique dans l'axone d'un nerf périphérique chez le rat altère sa régénération après une lésion (Gaete et al, 1998). En 2008, Court et al ont injecté un lentivirus contenant dans son génome une construction permettant la synthèse de la protéine ribosomale L4 couplée à la GFP, dans un nerf périphérique en aval d'une lésion. Ils observent l'apparition de ribosomes fluorescents dans l'axone du nerf sectionné. Ces ribosomes proviennent donc d'un génome présent localement en aval de la lésion, qui ne peut être que celui des cellules de Schwann qui entourent l'axone et forment la gaine de myéline.

Ces résultats, combinés à ceux de Giudetta en 2002, proposent le transfert d'ARN et de protéines ribosomales entre cellules gliales et axone. Or Bucheit et al en 1992 avaient

observé un transfert de molécules entre ces cellules par l'intermédiaire de vésicules colorées par l'acridine orange, un colorant capable de marquer certains compartiments vésiculaires des cellules gliales, et notamment séquestré dans les compartiments plutôt acides, comme les endosomes.

La récente découverte de la présence d'ARN dans les exosomes combinée à la mise en évidence de la sécrétion exosomale par les cellules gliales laissent pressentir que ce transport des ARN et des protéines ribosomales entre cellules gliales et neurones se ferait par l'intermédiaire des exosomes.

5. Rôle possible des exosomes dans le développement

Les homéoprotéines sont des facteurs de transcription qui régulent la plupart des évènements de morphogénèse se produisant pendant le développement des métazoaires. Elles peuvent être sécrétées à partir d'une source locale pour se répartir en gradient dans le tissu, où elles contrôlent l'activité transcriptionnelle des cellules alentour. Parmi elles, la protéine *Engrailed* interviendrait dans le guidage axonal lors de la mise en place du système nerveux. Initialement localisée dans le noyau cellulaire, la présence d'*Engrailed* dans le cytosol, ainsi que sa sécrétion dans le milieu extracellulaire par une voie non classique a été démontrée (Joliot et al, 1997). La protéine a été retrouvée associée à des membranes résistantes aux détergents, enrichies en cavéoline et cholestérol, ce qui pourrait suggérer une voie de sécrétion exosomale, pour une partie au moins de la protéine. En outre, il a été montré que l'établissement du gradient d'une autre homéoprotéine, *Decapentaplegic* (Dpp), dépend de la balance recyclage/dégradation déterminée dans la voie endocytaire (Entchev et al, 2000). Il est intéressant de noter que Dpp serait l'homologue du TGF β chez la drosophile. Or il a été démontré que le TGF β est sécrété par la voie exosomale (Clayton et al, 2007).

En 2001, Greco et al proposent le terme d'argosomes pour désigner des microvésicules sécrétées par les cellules des disques imaginaux de la drosophile. Ces microvésicules sont marquées par la protéine GFP couplée à une ancre GPI, sont localisées dans les endosomes, et sont capables d'établir un gradient en se transférant de cellules en cellules. Les argosomes contiennent les protéines morphogènes *Wingless* et *Hedgehog*, et pourraient être impliqués dans leur diffusion à travers le tissu. Les auteurs évoquent le fait que les « argosomes » pourraient correspondre aux exosomes, bien qu'ils n'en vérifient pas les caractéristiques. Une étude menée sur la sécrétion de *Hedgehog* au niveau du pôle apical des cellules épithéliales chez *C. elegans* a montré que la sous-unité V0 de la pompe à proton V-ATPase (*vacuolar adenosine triphosphatase*) serait impliquée dans la fusion des endosomes

multivésiculaire avec la membrane plasmique et dans la sécrétion de Hedgehog. En effet, les mutants de la sous-unité V0 accumulent le morphogène Hedgehog dans des compartiments multivésiculaires très denses qui ne fusionnent pas avec la membrane plasmique (Liégeois et al, 2001). Il pourrait d'explorer cette voie de régulation dans les neurones, qui sont, comme les cellules épithéliales, des cellules polarisées.

Une étude intéressante suggère que les exosomes pourraient également être impliqués dans la voie de signalisation Notch. Cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire pendant le développement, où elle permet par exemple la mise en place des organes sensoriels et la division des précurseurs neuronaux. Une inactivation de la voie Notch est nécessaire pour arrêter le cycle et permettre la différenciation des précurseurs. L'interaction du récepteur de surface Notch, avec son ligand transmembranaire Delta à la surface d'une cellule adjacente, entraîne le clivage de Notch par les enzymes ADAM17 (α -sécrétase également impliquée dans le clivage de l'APP), et γ -sécrétase. Le clivage par la γ -sécrétase entraîne la libération du NICD (*Notch intracellular domain*), qui active la transcription de gènes impliqués dans la division cellulaire. Or, de façon curieuse, il a été montré que l'internalisation du ligand Delta est nécessaire à l'activation de cette voie. Delta pourrait être envoyé dans les ILV, puis sécrété en association avec les exosomes avant d'interagir en surface avec Notch (Ristorcelli et al, 2009, Dudu et al, 2004).

Il est également intéressant de noter que les exosomes de mastocytes contiennent des microARN impliqués dans l'embryogénèse: let-7 est un microARN qui intervient dans la différenciation des cellules souches, miR-1 pendant l'organogénèse, et miR-181 durant l'hématopoïèse. Ces microARN ont tous été détectés dans les exosomes des mastocytes (Valadi et al, 2007, Lotvall et al, 2007). Le transfert de microARN, et d'ARNm, par la voie exosomale pourrait par exemple permettre de synchroniser et d'orienter la différenciation d'un pool de cellules pendant l'embryogénèse.

L'ensemble de ces travaux suggère que les exosomes pourraient participer à l'établissement de la polarité chez l'embryon, ainsi qu'à la prolifération puis la différenciation cellulaire pendant le développement.

IV. Interaction avec les cellules cibles

1. Les exosomes ont-ils une cible cellulaire spécifique ?

On peut imaginer que les protéines qui interviennent dans la fixation des exosomes à la surface des cellules assurent le ciblage des exosomes vers un type cellulaire donné, en permettant ou au contraire inhibant certaines associations.

Des études sur la propagation de la PrP^{sc} ont révélé que des exosomes d'une lignée cellulaire épithéliale surexprimant la protéine, sont capables d'initier la conversion PrP^c/sc dans une lignée neuronale (Vella et al, 2007). Cette expérience se rapproche de ce qui pourrait se passer dans l'organisme lors d'une infection à partir de la périphérie et de sa propagation au SNC. Il a également été montré que des exosomes de cellules dendritiques sont capables d'activer des lymphocytes T compétents (Théry et al, 2002), et des exosomes de mastocytes peuvent activer des lymphocytes (Skokos et al, 2001). On sait d'autre part que des exosomes de cellules tumorales peuvent interagir avec des cellules endothéliales (Skog et al, 2008). Aux vues de ces divers résultats, les exosomes ne semblent pas avoir de cible cellulaire spécifique.

Pourtant, Valadi et al ont montré que les ARNm sécrétés dans les exosomes de mastocytes peuvent être transférés à d'autres mastocytes, mais en revanche, l'échange semble impossible avec des lymphocytes T CD4⁺. Il se pourrait donc qu'il existe dans certains cas une restriction au niveau du type de cellules ciblé par les exosomes. Cette spécificité peut être plus ou moins large en fonction de l'origine cellulaire des exosomes, et pourrait impliquer des protéines d'adhésion spécifique d'un tissu qui agiraient de façon permissive, ou répulsive, sur l'accès des exosomes à la surface cellulaire.

Il sera à présent très intéressant de connaître les lois qui régissent les interactions exosomes / cellules cibles, car cela pourrait nous amener à mieux comprendre les mécanismes d'apparition, et de propagation, de certaines pathologies dans des compartiments tissulaires spécifiques.

2. Quel mécanisme d'interaction en surface ?

Les observations que nous avons réalisées au microscope électronique à transmission ont révélé la présence de chapelets d'exosomes posés à la surface des neurones, ainsi que d'autres pris dans des puits de clathrine. Ces observations suggèrent que les exosomes peuvent interagir avec la membrane plasmique, puis être endocytés dans les neurones via un mécanisme clathrine-dépendant. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour montrer qu'il s'agit bien d'exosomes (immunogold avec un marqueur exosomal). Nous pourrions ensuite regarder si cette fixation en surface dépend du Ca²⁺, en incubant les exosomes sur les neurones en présence d'un chélateur de calcium, puis tester si des protéines comme LFA-1, comme dans le cas des cellules endothéliales (Rieu et al, 2000), mais aussi

des intégrines, ou la L1-CAM, sont impliquées dans cette adhérence. Des expériences complémentaires sont aujourd'hui en cours pour suivre en microscopie confocale l'incorporation d'exosomes marqués par la protéine de fusion GFP-CD63 dans des neurones d'hippocampe en culture.

La découverte des exosomes neuronaux représente une ouverture importante dans l'avancée des connaissances sur le fonctionnement du système nerveux en conditions à la fois normales et pathologiques. Ils sont susceptibles d'être impliqués dans les modulations de l'activité synaptique normale, et aussi dans la propagation de facteurs pathologiques protéiques, viraux, nucléiques, lipidiques à travers les circuits neuronaux des systèmes nerveux central et périphérique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abulrob A, Tauskela JS, Mealing G, Brunette E, Faid K, Stanimirovic D. (2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem.* 92(6):1477-86.
- Acconcia F, Sigismund S, Polo S. (2009) Ubiquitin in trafficking: The network at work. *Exp Cell Res.*
- Akbar MA, Ray S, Krämer H. (2009) The SM protein Car/Vps33A regulates SNARE-mediated trafficking to lysosomes and lysosome-related organelles. *Mol Biol Cell.* 20(6):1705-14.
- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK. (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis.* 20(2):187-98.
- Amzallag N, Passer BJ, Allanic D, Segura E, Théry C, Goud B, Amson R, Telerman A. (2004) TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem.* 279(44):46104-12.
- André F, Chaput N, Schartz NE, Flament C, Aubert N, Bernard J, Lemonnier F, Raposo G, Escudier B, Hsu DH, Tursz T, Amigorena S, Angevin E, Zitvogel L. (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(4):2126-36.
- Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. (1999) The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell.* 10(5):1463-75.
- Aniento F, Emans N, Griffiths G, Gruenberg J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol.* 123(6 Pt 1):1373-87.
Erratum in: *J Cell Biol* (1994) Feb;124(3):397.
- Antonin W, Holroyd C, Tikkanen R, Höning S, Jahn R. (2000) The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol Biol Cell.* 11(10):3289-98.
- Arantes RM, Andrews NW. (2006) A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J Neurosci.* 26(17):4630-7.
- Arita S, Baba E, Shibata Y, Nihiro H, Shimoda S, Isobe T, Kusaba H, Nakano S, Harada M. (2008) B cell activation regulates exosomal HLA production. *Eur J Immunol.* 38(5):1423-34.
Comment in: *Eur J Immunol.* 2008.
- Ayala GX, Tapia R. (2008) HSP70 expression protects against hippocampal neurodegeneration induced by endogenous glutamate in vivo. *Neuropharmacology.* 55(8):1383-90.
- Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO.* 17(11):2982-93.
- Babst M. (2005) A protein's final ESCRT. *Traffic.* 6 :2-9.
- Bacia K, Schwille P, Kurzchalia T. (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(9):3272-7.
- Barber K, Enam SA, Bodovitz S, Falduto M, Frail D, Klein WL. (1995) Particulate forms of APP in the extracellular milieu of cultured cells. *Exp Neurol.* 132(1):42-53.
- Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B. (2002) Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J.* 21(5):1031-40.

- Baron GS, Magalhães AC, Prado MA, Caughey B. (2006) Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. *J Virol.* 80(5):2106-17.
- Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A. (2005) Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol.* 175(5):2900-12.
- Beal MF. (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6(15):3338-44. *Review.*
- Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC. (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci.* (12):1291-300.
- Bette-Bobillo P, Giro P, Sainte-Marie J, Vidal M. (1995) Exoenzyme S from *P. aeruginosa* ADP ribosylates rab4 and inhibits transferrin recycling in SLO-permeabilized reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 244(2):336-41.
- Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD. (2002) Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron.* 36(3):435-49.
- Bliss TV, Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232(2):331-56.
- Bohnert S, Schiavo G. (2005) Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation. *J Biol Chem.* 280(51):42336-44.
- Boquet P, Duflot E. (1982) Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(24):7614-8.
- Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, Gould SJ. (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol.* 172(6):923-35.
- Bordet T, Castelnaup-Ptakhine L, Fauchereau F, Friocourt G, Kahn A, Haase G. (2001) Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Mol Cell Neurosci.* 17(5):842-54.
- Borgdorff AJ, Choquet D. (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature.* 417(6889):649-53
- Braak H, Braak E. (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 53:127-40.
- Buckner RL, Sepulcre J, Talukdar T, Krienen FM, Liu H, Hedden T, Andrews-Hanna JR, Sperling RA, Johnson KA. (2009) Cortical hubs revealed by intrinsic functional connectivity: mapping, assessment of stability, and relation to Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 29(6):1860-73.
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* 73(7):1339-47.
Comment in: *Cell.* 116(2 Suppl):S111-3, 2 p following S113.
- Buchheit TE, Tytell M. (1992) Transfer of molecules from glia to axon in the squid may be mediated by glial vesicles. *J Neurobiol.* 23(3):217-30.
- Caillé I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Müller U, Prochiantz A. (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* 131(9):2173-81.
- Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, Gottlinger H, Campadelli-Fiume G, Palu G, Parolin C. (2007) The intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional multivesicular bodies biogenesis. *J. Virol.* 81 :11468-11478.
- Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA. (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol.* 157(1):277-86.

- Caughey B, Baron GS. (2006) Prions and their partners in crime. *Nature*. 443(7113):803-10.
- Ceccarelli S, Visco V, Raffa S, Wakisaka N, Pagano JS, Torrisi MR. (2007) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 promotes concentration in multivesicular bodies of fibroblast growth factor 2 and its release through exosomes. *Int J Cancer*. 121(7):1494-
- Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG. (2008) Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol*. 180(9):5779-83.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 360(6405):672-4.
- Chevallier J, Chamoun Z, Jiang G, Prestwich G, Sakai N, Matile S, Parton RG, Gruenberg J (2008) Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J Biol Chem*. 283(41):27871-80.
- Chow AY, Mellman I. (2005) Trends Immunol. Old lysosomes, new tricks: MHC II dynamics in DCs. 26(2):72-8.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM. (2005) Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*. 48(6):913-22.
Comment in: *Neuron*. (2005) 48(6):873-5.
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM. (2008) Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron*. 58(1):42-51.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 360(6405):672-4.
- Coen L, Osta R, Maury M, Brûlet P. (1997) Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(17):9400-5.
- Colás C, Grasa P, Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. (2009) Changes in calmodulin immunocytochemical localization associated with capacitation and acrosomal exocytosis of ram spermatozoa. *Theriogenology*. 71(5):789-800.
- Cooney JR, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM, Fiala JC. (2002) Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J Neurosci*. 22(6):2215-24.
- Court FA, Hendriks WT, Macgillavry HD, Alvarez J, van Minnen J. (2008) Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J Neurosci*. 28(43):11024-9.
- Daley JK, Gechman LA, Skipworth J, Rall GF. (2005) Poliovirus replication and spread in primary neuron cultures. *Virology*. 340(1):10-20.
- de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 102(13):4336-44.
- Deinhardt K, Berninghausen O, Willison HJ, Hopkins CR, Schiavo G. (2006) Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J Cell Biol*. 174(3):459-71.
- Delaguillaumie A, Harriague J, Kohanna S, Bismuth G, Rubinstein E, Seigneuret M, Conjeaud H. (2004) Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J Cell Sci*. 117(Pt 22):5269-82.

- Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. (2000) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* 113 Pt 19:3365-74. *Review.*
- Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. (2000) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol.* 165(3):1259-65.
- Doherty GJ, McMahon HT. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 78:857-902.
- Doyotte A, Russell MR, Hopkins CR, Woodman PG. (2005) Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci.* 118(Pt 14):3003-17.
- Dudu V, Pantazis P, González-Gaitán M. (2004) Membrane traffic during embryonic development: epithelial formation, cell fate decisions and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 16(4):407-14.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science.* 290(5495):1364-8.
- Ehlers M.D. (2000) Reinsertion or degradation of AMPA Receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron.* 28 :511-525.
- Entchev EV, Schwabedissen A, González-Gaitán M. (2000) Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell.* 103(6):981-91.
- Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem.* 273(32):20121-7.
- Fader CM, Savina A, Sánchez D, Colombo MI. (2005) Exosome secretion and red cell maturation: Exploring molecular components involved in the docking and fusion of multivesicular bodies in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis.* 35(2):153-7.
- Falguières T, Luyet PP, Bissig C, Scott CC, Velluz MC, Gruenberg J. (2008) In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol Biol Cell.* 19(11):4942-55.
- Fan D, Grooms SY, Araneda RC, Johnson AB, Dobrenis K, Kessler JA, Zukin RS. (1999) AMPA receptor protein expression and function in astrocytes cultured from hippocampus. *J Neurosci Res.* 57(4):557-71.
- Fang Y, Wu N, Gan X, Yan W, Morrell JC, Gould SJ. (2007) Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol.* 5(6):e158.
- Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R. (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci.* 31(4):642-8.
- Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S, Neefjes J. (1999) Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol.* 14;9(1):55-8.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9683-8.
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A. (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol.* 179(3):485-500.
- Fitzner D, Schneider A, Kippert A, Möbius W, Willig KI, Hell SW, Bunt G, Gaus K, Simons M. (2006) Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *EMBO J.* 25(21):5037-48.

- Forder JP, Tymianski M. (2009) Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules. *Neuroscience*. 158(1):293-300.
- Francesconi A, Kumari R, Zukin RS. (2009) Regulation of group I metabotropic glutamate receptor trafficking and signaling by the caveolar/lipid raft pathway. *J Neurosci*. 29(11):3590-602.
- Frick M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ. (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol*. 17(13):1151-6.
- Gaete J, Kameid G, Alvarez J. (1998) Regenerating axons of the rat require a local source of proteins. *Neurosci Lett*. 251(3):197-200.
- Galli T, Chilcote T, Mundigl O, Binz T, Niemann H, De Camilli P. (1994) Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells. *J Cell Biol*. 125(5):1015-24.
- Gatti JL, Métayer S, Belghazi M, Dacheux F, Dacheux JL. (2005) Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod*. 72(6):1452-65.
- Géminard C, Nault F, Johnstone RM, Vidal M. (2001) Characteristics of the interaction between Hsc70 and the transferrin receptor in exosomes released during reticulocyte maturation. *J Biol Chem*. 276(13):9910-6.
- Géminard C, De Gassart A, Blanc L, 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(3):181-93.
- Geuze HJ, Slot JW, Schwartz AL. (1987) Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J Cell Biol*. 104(6):1715-23.
- Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 11(9):1143-9.
- Giuditta A, Eyman M, Kaplan BB. (2002) Gene expression in the squid giant axon: neurotransmitter modulation of RNA transfer from periaxonal glia to the axon. *Biol Bull*. 203(2):189-90.
- Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE. (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(19):10592-7.
- Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. (2009) Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J*. 23(5):1541-57.
- Greco V, Hannus M, Eaton S. (2001) Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell*. 106(5):633-45.
- Gulbins E, Kolesnick R. (2003) Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene*. 22(45):7070-7.
- Guo Z, Turner C, Castle D. (1998) Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell*. 94(4):537-48.
- Grbovic OM, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Dinakar R, Summers-Terio NB, Ceresa BP, Nixon RA, Cataldo AM. (2003) Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem*. 278(33):31261-8.
- Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE. (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol*. 108(4):1301-16.

- Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M, Margulis B. (2001) In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res.* 914(1-2):66-73.
- Han K, Kim E. (2008) Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Prog Neurobiol.* 84(3):263-83.
- Hanley JG, Henley JM. (2005) PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking. *EMBO J.* 24(18):3266-78.
- Hanley JG. (2008) PICK1: a multi-talented modulator of AMPA receptor trafficking. *Pharmacol Ther.* 118(1):152-60.
- Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE. (2008) Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol.* 180(2):389-402.
- Hanson PI, Shim S, Merrill SA. (2009) Cell biology of the ESCRT machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 21(4):568-74.
- Hardingham GE, Bading H. (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* 26(2):81-9.
- Harris EW, Ganong AH, Cotman CW. (1984) Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* 323(1):132-7.
- Havik B, Rokke H, Bardsen K, Davanger S, Bramham C. (2003) Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of pre-existing α -CaMKII mRNA to synapses : a mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. *Eur. J. Neurosci.* 17 : 2679-2689.
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood.* 94(11):3791-9.
- Hemler ME. (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:397-422.
- Hering H, Lin CC, Sheng M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci.* 23(8):3262-71.
- Herreros J, Ng T, Schiavo G. (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell.* 12(10):2947-60.
- Hirling H. (2009) Endosomal trafficking of AMPA-type glutamate receptors. *Neuroscience.* 158(1):36-44. *Review.*
- Hoffman EA, Perkumas KM, Highstrom LM, Stamer WD (2009) Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50(3):1313-8.
- Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L. (2008) Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* 15(1):80-8.
- Ip CW, Kroner A, Bendszus M, Leder C, Kobsar I, Fischer S, Wiendl H, Nave KA, Martini R. (2006) Immune cells contribute to myelin degeneration and axonopathic changes in mice overexpressing proteolipid protein in oligodendrocytes. *J Neurosci.* 26(31):8206-16.
- Ishitani R, Chuang DM. (1996) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(18):9937-41.
- Izumi T, Gomi H, Kasai K, Mizutani S, Torii S. (2003) The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. *Cell Struct Funct.* 28(5):465-74.

- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 262(19):9412-20.
- Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. (1989) Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood.* 74(5):1844-51.
- Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K. (1991) Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol.* 147(1):27-36.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Pradat PF, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw JJ, Loeffler JP, Meininger V. (2005) Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol.* 57(4):553-6.
- Joliot A, Trembleau A, Raposo G, Calvet S, Volovitch M, Prochiantz A. (1997) Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development.* 124(10):1865-75.
- Joshi S, Levatte MA, Dekaban GA, Weaver LC. (1995) Identification of spinal interneurons antecedent to adrenal sympathetic preganglionic neurons using trans-synaptic transport of herpes simplex virus type 1. *Neuroscience.* (1995) 65(3):893-903.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron.* 37(6):925-37.
- Kennedy MJ, Ehlers MD. (2006) Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 29:325-62.
- Kiss AL, Botos E. (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med.*
- Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rudensky AY, Ossendorp F, Melief CJ, Stoorvogel W, Geuze HJ. (2001) Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol.* 155(1):53-63.
- Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature.* 392(6672):193-7.
- Koh JY, Yang LL, Cotman CW. (1990) Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 533(2):315-20.
- Kokubo H, Saido TC, Iwata N, Helms JB, Shinohara R, Yamaguchi H. (2005) Part of membrane-bound Abeta exists in rafts within senile plaques in Tg2576 mouse brain. *Neurobiol Aging.* 26(4):409-18.
- Koo EH, Squazzo SL. (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 269(26):17386-9.
- Krämer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Möbius W, Berger H, Nave KA, Schild H, Trotter J. (2007) Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins : Trophic support for axons ? *Proteomics Clin. Appl.* 1 :1446-1461
- Kuratomi G, Komuro A, Goto K, Shinozaki M, Miyazawa K, Miyazono K, Imamura T. (2005) NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *Biochem J.* 386(Pt 3):461-70.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 27(4):796-807.

- Lajoie P, Nabi IR. (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med* 11(4):644-53.
- Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. (2008) Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* 18(5):199-209.
- Lalli G, Schiavo G. (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol.* 156(2):233-9.
- Lalli G, Gschmeissner S, Schiavo G. (2003) Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons. *J Cell Sci.* 116(Pt 22):4639-50.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(11):6448-53.
- Lancaster GI, Febbraio MA (2005) Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem.* 280(24):23349-55.
- Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehler J, Gottlinger HG, Weissenhorn W. (2008) Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science.* 321(5894):1354-7.
- Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457(7233):1128-32.
Comment in: *Nature* (2009) 457(7233):1090-1.
- Le Blanc I, Luyet PP, Pons V, Ferguson C, Emans N, Petiot A, Mayran N, Demaurex N, Fauré J, Sadoul R, Parton RG, Gruenberg J. (2005) Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol.* 7(7):653-64.
Comment in: *Nat Cell Biol.* (2005) 7(7):641-2
- Lee SH, Simonetta A, Sheng M. (2004) Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron.* 43(2):221-36.
- Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB. (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol.* 17(18):1561-7.
Erratum in: *Curr Biol.* (2007) 17(18):1622.
- Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ. (2008) Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(9):1835-49.
- Li Y, Nowotny P, Holmans P, Smemo S, Kauwe JS, Hinrichs AL, Tacey K, Doil L, van Luchene R, Garcia V, Rowland C, Schrodi S, Leong D, Gogic G, Chan J, Cravchik A, Ross D, Lau K, Kwok S, Chang SY, Catanese J, Sninsky J, White TJ, Hardy J, Powell J, Lovestone S, Morris JC, Thal L, Owen M, Williams J, Goate A, Grupe A. (2004) Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(44):15688-93.
Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) 103(16):6411.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P. (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med.* 14(5):501-3.
Comment in: *Nat Med.* (2008) 14(5):483-5.
- Liégeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M. (2006) The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* 173(6):949-61.

- Lobito AA, Kimberley FC, Muppidi JR, Komarow H, Jackson AJ, Hull KM, Kastner DL, Sreaton GR, Siegel RM. (2006) Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in TNFR1-associated periodic fever syndrome (TRAPS). *Blood*. 108(4):1320-7.
- Looze C, Yui D, Leung L, Ingham M, Kaler M, Yao X, Wu WW, Shen RF, Daniels MP, Levine SJ. (2009) Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 378(3):433-8.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA. (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 3(5):460-4.
- Lotvall J, Valadi H. (2007) Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr*. 1(3):156-8.
- Luyet PP, Falguières T, Pons V, Pattnaik AK, Gruenberg J. (2008) The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic*. 9(12):2279-90.
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8):622-32. *Review*.
- McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, Zerial M. (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*. 98(3):377-86.
- Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*. 10(6):839-50.
- Malinow R, Malenka RC. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 25:103-26.
- Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon HT. (2001) GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*, 410(6825):231-5.
- Marta CB, Taylor CM, Coetzee T, Kim T, Winkler S, Bansal R, Pfeiffer SE. (2003) Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J Neurosci*. 23(13):5461-71.
- Martinez I, Chakrabarti S, Hellevik T, Morehead J, Fowler K, Andrews NW. (2000) Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol*. 148(6):1141-49.
- Martins VR, Mercadante AF, Cabral AL, Freitas AR, Castro RM. (2001) Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz J Med Biol Res*. 34(5):585-95.
- Maskos U, Kissa K, St Clément C, Brûlet P. (2002) Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(15):10120-5.
- Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Fauré J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J. (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*. 303(5657):531-4.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieger FW. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 294(5545):1354-7.
- Mayor S, Pagano RE. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(8):603-12.
- Mesulam M. (2009) Defining neurocognitive networks in the BOLD new world of computed connectivity. *Neuron*. 62(1):1-3.
Comment on: *Neuron*. (2009) 62(1):42-52.

- Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. (2007) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 450(7168):435-9.
- Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G. (2004) Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* 12(10):442-6. *Review.*
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD Jr, Thomson AW. (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 104(10):3257-66.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 319(6056):774-6.
- Mullock BM, Smith CW, Ihrke G, Bright NA, Lindsay M, Parkinson EJ, Brooks DA, Parton RG, James DE, Luzio JP, Piper RC. (2000) Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with Vamp 8, and is required for late endosome-lysosome fusion. *Mol Biol Cell*. 11(9):3137-53.
- Munro P, Kojima H, Dupont JL, Bossu JL, Poulain B, Boquet P. (2001) High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 289(2):623-9.
- Murashov AK, Chintalgattu V, Islamov RR, Lever TE, Pak ES, Sierpinski PL, Katwa LC, Van Scott MR. (2007) RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons. *FASEB J*. 21(3):656-70.
- Murk JL, Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ. (2002) The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin Cell Dev Biol*. 13(4):303-11.
- Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, Zamborlini A, Usami Y, Gottlinger H, Weissenhorn W. (2006) Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell*. 10(6):821-30.
- Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. (2003) Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem*. 278(52):52347-54.
- Nickerson DP, West M, Odorizzi G. (2006) Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J Cell Biol*. 175(5):715-20.
Erratum in: *J Cell Biol*. (2006) 175(6):1043.
- Nickerson DP, Russell MR, Odorizzi G. (2007) A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO* 8(7):644-50.
- Nickerson DP, Brett CL, Merz AJ. (2009) Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr Opin Cell Biol*. 21(4):543-51.
- Nicoll RA, Tomita S, Brecht DS. (2006) Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science*. 311(5765):1253-6.
- Nixon RA. (2005) Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 26(3):373-82.
- Ono M, Handa K, Sonnino S, Withers DA, Nagai H, Hakomori S. (2001) GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry*. 40(21):6414-21.
- Ohya T, Miaczynska M, Coskun U, Lommer B, Runge A, Drechsel D, Kalaidzidis Y, Zerial M. (2009) Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature*. 459(7250):1091-7.
Comment in: *Nature* (2009) 459(7250):1065-6.
- Ono A, Freed EO. (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(24):13925-30.

- Ono A, Waheed AA, Freed EO. (2007) Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Virology*. 360(1):27-35.
- Page RM, Baumann K, Tomioka M, Pérez-Revuelta BI, Fukumori A, Jacobsen H, Flohr A, Luebbbers T, Ozmen L, Steiner H, Haass C. (2008) Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation. *J Biol Chem*. 283(2):677-83.
- Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 101(3):942-8.
- Parent A, Hamelin E, Germain P, Parent JL. (2009) Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *Biochem J*. 418(1):163-72.
- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD. (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*. 52(5):817-30.
Comment in: *Neuron* (2006) 52(5):746-8.
- Parton RG, Ockleford CD, Crichtley DR. (1987) A study of the mechanism of internalisation of tetanus toxin by primary mouse spinal cord cultures. *J Neurochem*. 49(4):1057-68.
- Parton RG, Simons K, Dotti CG. (1992) Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons. *J Cell Biol*. 119(1):123-37.
- Passafaro M, Piëch V, Sheng M. (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. 4(9):917-26.
- Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. (2004) Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol*. 12(7):310-6.
- Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH (1999) Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem*. 274(27):18851-6.
- Piper RC, Katzmann DJ. (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23:519-47.
- Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(36):13368-73.
- Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He GP, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI. (2003) HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol*. 162(3):425-34.
- Prado MA, Alves-Silva J, Magalhães AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR. (2004) PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *J Neurochem*. 88(4):769-81. *Review*
- Prado N, Marazuela EG, Segura E, Fernández-García H, Villalba M, Théry C, Rodríguez R, Batanero E. (2008) Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol*. 181(2):1519-25.
- Prekeris R, Klumperman J, Chen YA, Scheller RH. (1998) Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol*. 143(4):957-71.
- Pryor PR, Mullock BM, Bright NA, Gray SR, Luzio JP. (2000) The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J Cell Biol*. 149(5):1053-62.
- Putz U, Howitt J, Lackovic J, Foot N, Kumar S, Silke J, Tan SS. (2008) Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4 family proteins. *J Biol Chem*. 283(47):32621-7

- Qu Y, Dubyak GR. (2009) P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal.* 5(2):163-73.
- Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP. (2009) Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis*
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(30):11172-7.
- Rabesandratana H, Toutant JP, Reggio H, Vidal M. (1998) Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during In vitro maturation of reticulocytes. *Blood.* 91(7):2573-80.
- Raiborg C, Stenmark H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 458(7237):445-52.
- Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW. (2004) Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 279(19):20471-9.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 183(3):1161-72.
- Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H. (2002) Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic.* 3(10):718-29.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem.* 272(9):5482-6.
- Rieu S, Géminard C, Rabesandratana H, Sainte-Marie J, Vidal M. (2000) Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. *Eur J Biochem.* 267(2):583-90.
- Rind HB, Butowt R, von Bartheld CS. (2005) Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci.* 25(3):539-49.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell.* 122(5):735-49.
- Ristorcelli E, Beraud E, Mathieu S, Lombardo D, Verine A. (2009) Essential role of Notch signaling in apoptosis of human pancreatic tumoral cells mediated by exosomal nanoparticles. *Int J Cancer.* 125(5):1016-26.
- Robbins AR, Ward RD, Oliver C. (1995) A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J Cell Biol.* 130(5):1093-104.
- Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida OF. (2005) Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 25(48):11061-70.
- Rostad SW, Olson K, McDougall J, Shaw CM, Alvord EC Jr. (1989) Transsynaptic spread of varicella zoster virus through the visual system: a mechanism of viral dissemination in the central nervous system. *Hum Pathol.* (1989) 20(2):174-9.
Erratum in: *Hum Pathol* (1989) 20(8):820.
- Roux S, Colasante C, Saint Clément C, Barbier J, Curie T, Girard E, Molgó J, Brûlet P. (2005) Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Mol Cell Neurosci.* 30(4):572-82.
- Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, Binz T. (2003) Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol.* 326(3):835-47.

- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 303(5660):1007-10.
- Saksena S, Sun J, Chu T, Emr SD. (2007) ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci*. 32(12):561-73.
- Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD. (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*. 136(1):97-109.
Comment in: *Cell*. 2009 Jan 9;136(1):15-7.
- Saunderson SC, Schuberth PC, Dunn AC, Miller L, Hock BD, MacKay PA, Koch N, Jack RW, McLellan AD. (2008) Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol*. 180(12):8146-52.
- Savina A, Vidal M, Colombo MI. (2002) The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci*. 115(Pt 12):2505-15.
- Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*. 278(22):20083-90.
- Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI. (2005) Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*. 6(2):131-43.
- Sawa A, Khan AA, Hester LD, Snyder SH. (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(21):11669-74.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C. (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 359(6398):832-5.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. 439(7074):283-9.
Erratum in: *Nature*. (2006) 441(7095):902.
- Scott JR, Davies D, Fraser H. (1992) Scrapie in the central nervous system: neuroanatomical spread of infection and Sinc control of pathogenesis. *J Gen Virol*. 73 (Pt 7):1637-44.
- Seeley WW, Crawford RK, Zhou J, Miller BL, Greicius MD. (2009) Neurodegenerative diseases target large-scale human brain networks. *Neuron*. 62(1):42-52.
Comment in: *Neuron*. (2009) 62(1):1-3.
- Segura E, Guérin C, Hogg N, Amigorena S, Théry C. (2007) CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol* 179(3):1489-96.
- Selak S, Paternain AV, Fritzler MJ, Lerma J. (2006) Human autoantibodies against early endosome antigen-1 enhance excitatory synaptic transmission. *Neuroscience*. 143(4):953-64.
- Selkoe DJ, Yamazaki T, Citron M, Podlisny MB, Koo EH, Teplow DB, Haass C. (1996) The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*. 777:57-64.
- Selkoe DJ. (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*. 192(1):106-13. *Review*.
- Senechal Y, Kelly PH, Dev KK. (2008) Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behav Brain Res*. 186(1):126-32.

- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci.* 27(11):2866-75.
- Shapiro RE, Specht CD, Collins BE, Woods AS, Cotter RJ, Schnaar RL. (1997) Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand. *J Biol Chem.* 272(48):30380-6.
- Sharples RA, Vella LJ, Nisbet RM, Naylor R, Perez K, Barnham KJ, Masters CL, Hill AF. (2008) Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J.* 22(5):1469-78.
- Siegel G, Obernosterer G, Fiore R, Oehmen M, Bicker S, Christensen M, Khudayberdiev S, Leuschner PF, Busch CJ, Kane C, Hübel K, Dekker F, Hedberg C, Rengarajan B, Drepper C, Waldmann H, Kauppinen S, Greenberg ME, Draguhn A, Rehmsmeier M, Martinez J, Schratt GM. (2009) A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 11(6):705-16.
- Simons M, Kramer EM, Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA, Schulz JB. (2002) Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 157(2):327-36.
- Simons M, Trajkovic K. (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci.* 119(Pt 21):4381-9.
- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J. (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet.* 37(8):806-8.
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 10(12):1470-6.
- Skokos D, Le Panse S, Villa I, Rousselle JC, Peronet R, Namane A, David B, Mécheri S. (2001) Nonspecific B and T cell-stimulatory activity mediated by mast cells is associated with exosomes. *Int Arch Allergy Immunol.* 124(1-3):133-6.
- Sobo K, Chevallier J, Parton RG, Gruenberg J, van der Goot FG. (2007) Diversity of raft-like domains in late endosomes. *PLoS One.* 2(4):e391.
- Steiner P, Sarria JC, Glauser L, Magnin S, Catsicas S, Hirling H. (2002) Modulation of receptor cycling by neuron-enriched endosomal protein of 21 kD. *J Cell Biol.* 157(7):1197-209.
- Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M. (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13(6):1287-96.
- Stenmark H, Olkkonen VM. (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2(5):REVIEWS3007. Review.
- Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P. (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J.* 393(Pt 3):609-18.
- Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* 3(5):321-30. Review.
- Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell.* 114(6):689-99.

- Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. (2007) Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*. 89(2):205-12.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J*. 22(14):3591-601
- Suzuki T, Tian QB, Kuromitsu J, Kawai T, Endo S. (2007) Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by genetic chip microarray analysis. *Neurosc. Res.*, 972 : 168-176.
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK. (2002) Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol*. 161(5):1869-79.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127(4):831-46. Comment in: *Cell*. (2006) 127(4):671-3.
- Taylor CM, Coetzee T, Pfeiffer SE. (2002) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J Neurochem*. 81(5):993-1004.
- Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE. (2007) Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol*. 67(13):1815-29.
- Teis D, Saksena S, Emr SD. (2009) SnapShot: the ESCRT machinery. *Cell*. 137(1):182-182.e1.
- Theos AC, Truschel ST, Tenza D, Hurbain I, Harper DC, Berson JF, Thomas PC, Raposo G, Marks MS. (2006) A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev Cell*. 10(3):343-54.
- Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. (1999) Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*. 147(3):599-610.
- Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 166(12):7309-18.
- Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. (2002) Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*. 3(12):1156-62.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 9(8):581-93.
- Thinakaran G, Koo EH. (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 283(44):29615-9.
- Tienari PJ, Ida N, Ikonen E, Simons M, Weidemann A, Multhaup G, Masters CL, Dotti CG, Beyreuther K. (1997) Intracellular and secreted Alzheimer beta-amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(8):4125-30.
- Trajkovic K, Dhaunchak AS, Goncalves JT, Wenzel D, Schneider A, Bunt G, Nave KA, Simons M. (2006) Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol*. 172(6):937-48. Comment in: *J Cell Biol*. (2006) 172(6):799-801.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 319(5867):1244-7.

- Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, Heine U. (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 645(1):63-70.
- Trioulier Y, Torch S, Blot B, Cristina N, Chatellard-Causse C, Verna JM, Sadoul R. (2004) Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem*. 279(3):2046-52.
- Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG. (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*. 135(4):913-24.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 9(6):654-9.
- van der Goot FG, Gruenberg J. (2006) Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol*. 16(10):514-21. *Review*.
- van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, Bruyland M, Vandenberghe R, Dermaut B, De Pooter T, Peeters K, Santens P, De Deyn PP, Fisher EM, Collinge J, Isaacs AM, Van Broeckhoven C. (2008) CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum Mol Genet*. 17(2):313-22.
- Vanlandingham PA, Ceresa BP. (2009) Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem*. 284(18):12110-24.
- Van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M. (2001) Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*. 121(2):337-49.
- Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugière S, Tomaskovic-Crook E, Heath JK, Cerf-Bensussan N, Heyman M. (2003) Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*. 52(12):1690-7.
- Vassilieva EV, Ivanov AI, Nusrat A. (2008) Flotillin-1 stabilizes caveolin-1 in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(2):460-5.
- Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF. (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*. 211(5):582-90.
- Vella LJ, Sharples RA, Nisbet RM, Cappai R, Hill AF. (2008) The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J*. 37(3):323-32.
- Vella LJ, Greenwood DL, Cappai R, Scheerlinck JP, Hill AF. (2008) Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol*. 124(3-4):385-93.
- Verdier Y, Földi I, Sergeant N, Fülöp L, Penke Z, Janáky T, Szücs M, Penke B. (2008) Characterization of the interaction between Abeta 1-42 and glyceraldehyde phosphodehydrogenase. *J Pept Sci*. 14(6):755-62.
- Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, Wong PC, Xu H, Thinakaran G. (2004) Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem*. 279(43):44945-54.
- Vidal MJ, Stahl PD. (1993) The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation. *Eur J Cell Biol*. 60(2):261-7.
- Vidal M, Mangeat P, Hoekstra D. (1997) Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci*. 110 (Pt 16):1867-77.
- Vingtdeux V, Hamdane M, Loyens A, Gelé P, Drobeck H, Bégard S, Galas MC, Delacourte A, Beauvillain JC, Buée L, Sergeant N. (2007) Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem*. 282(25):18197-205.

- Volpicelli LA, Lah JJ, Fang G, Goldenring JR, Levey AI. (2002) Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci.* 22(22):9776-84.
- Vonderheit A, Helenius A. (2005) Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol.* 3(7):e233.
- Wang S, Jia Z, Roder J, Murphy TH. (2002) AMPA receptor-mediated miniature synaptic calcium transients in GluR2 null mice. *J Neurophysiol.* 88(1):29-40.
- White IJ, Bailey LM, Aghakhani MR, Moss SE, Futter CE. (2006) EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J.* 25(1):1-12.
- Williams RL, Urbé S. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(5):355-68.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* 7(3):297-303.
- Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature.* 458(7235):172-7.
Comment in: *Nature* (2009) 458(7235):159-60.
- Woodman PG, Futter CE. (2008) Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol.* 20(4):408-14.
- Wrigley JD, Ahmed T, Nevett CL, Findlay JB. (2000) Peripherin/rds influences membrane vesicle morphology. Implications for retinopathies. *J Biol Chem.* 275(18):13191-4.
- Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Möbius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem.* 278(13):10963-72.
- Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ. (2007) A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci.* 27(52):14459-69.
- Yu X, Harris SL, Levine AJ. (2006) The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 66(9):4795-801.
- Yu X, Riley T, Levine AJ. (2009) The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *FEBS J.* 276(8):2201-12.
- Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K. (2008) Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *J Neurochem.* 105(1):217-24.
- Yuyama K, Yanagisawa K. (2009) Late endocytic dysfunction as a putative cause of amyloid fibril formation in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 109(5):1250-60.
- Zhang YW, Wang R, Liu Q, Zhang H, Liao FF, Xu H. (2007) Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(25):10613-8.
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med.* 4(5):594-600.