



**HAL**  
open science

# Rôle des exosomes sécrétés par le muscle strié squelettique au cours de la myogenèse et en situation d'insulino-résistance

Alexis Forterre

► **To cite this version:**

Alexis Forterre. Rôle des exosomes sécrétés par le muscle strié squelettique au cours de la myogenèse et en situation d'insulino-résistance. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10287 . tel-00786035

**HAL Id: tel-00786035**

**<https://theses.hal.science/tel-00786035>**

Submitted on 7 Feb 2013

**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.

N° d'ordre : 287-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Alexis FORTERRE

# **Rôle des exosomes sécrétés par le muscle strié squelettique au cours de la myogenèse et en situation d'insulino-résistance**

Directrice de thèse : Dr Sophie ROME

Soutenue publiquement le 19 décembre 2012 devant un jury composé de

Dr H. Vidal	Président
Dr A. Bonnieu	Rapporteur
Dr K. Bouzakri	Rapporteur
Dr M. Cormont	Rapporteur
Dr S. Rome	Directrice de thèse

*Ce manuscrit est dédié à mes grands-pères*

# REMERCIEMENTS

*Comme pour tout manuscrit de thèse, je vais me plier à l'exercice de l'écriture des remerciements. Et non, je ne vais pas juste me remercier, comme certains ont pu le croire ! D'autant plus que les remerciements écrits en dernier, constituent la partie la plus lue et la plus appréciée... à mon grand regret, quand on voit le temps passé pour le reste du manuscrit, tout autant, voire plus intéressant... Bref, dans cette partie, je vais remercier toutes les personnes (sans en oublier, j'espère) qui ont permis (de près comme de loin) le bon déroulement et la réalisation de cette thèse au cours de ces trois ans.*

Je tiens à remercier en premier lieu Sophie Rome, qui m'a choisi pour être son « premier » thésard officiel et qui m'a encadré durant ces trois années de thèse. Après une brève incursion dans l'univers des miRs régulés par MEF2c, elle m'a proposé : Les EXOSOMES.... Si j'avais su ce qui m'attendait derrière ce mot, est-ce que j'aurais accepté ce changement de sujet ? La réponse peut paraître convenue, mais oui. J'aurais à nouveau choisi les exosomes, pour tout ce que ces nanovésicules m'ont permis d'explorer tant du point de vue des connaissances scientifiques que des techniques expérimentales.

Je souhaite aussi à remercier les membres du jury : Anne Bonnieu, Mireille Cormont et Karim Bouzakri, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce jury de thèse et d'avoir pris le temps de lire et juger ce travail scientifique. J'espère que cette thèse sur les exosomes les a intéressés et leurs a ouvert de nouvelles perspectives pour leurs travaux de recherche respectifs.

Je souhaite aussi remercier Hubert Vidal pour m'avoir accueilli au sein de l'unité CarMeN et d'avoir accepté la présidence du jury de thèse.

Je tiens à remercier également le directeur de l'équipe 2, Etienne Lefai, pour tous les conseils et suggestions donnés pour la réalisation des transfections cellulaires et de l'utilisation des adénovirus.

Un grand merci à Emmanuelle Danty et Alain Geloën pour m'avoir permis d'utiliser leur « appareil révolutionnaire » et pour toute leur disponibilité : merci Emmanuelle pour toutes les discussions sur le métier de chercheur ; merci Alain pour m'avoir permis de réaliser des manip's cruciales, qui comme par hasard tombaient les week-ends et jour fériés.... Merci de m'avoir permis d'entrer dans ce bâtiment, tout aussi impénétrable que Fort-Knox, qu'est l'IMBL/Insa.

Merci à Mathieu Baudet et Yohann Couté pour toutes les analyses protéomiques et pour nous avoir accueilli à Grenoble pour nous présenter leur laboratoire et expliqué le principe et les différentes étapes de leur travail.

Merci aussi à Elisabeth Errazurriz de nous avoir permis de visualiser les exosomes et d'associer imaginairement de belles photos de microscopie électronique à toutes les manip's basées sur les exos.

Merci également à Cécile Vors et Marie-Caroline Michalski pour toute leur disponibilité et leurs conseils pour la granulométrie

Je souhaite aussi remercier Karim Chikh pour sa disponibilité et son implication pour la réalisation d'un ELISA sur les exos du sérum.... Je regrette de n'avoir pas pu m'impliquer davantage dans ce travail les derniers mois de ma thèse.

Merci également à Dominique Ardail qui m'a permis d'utiliser (c'est un euphémisme), plutôt de « sur-exploiter » l'ultracentrifugeuse, pendant pratiquement tous les jours qui ont constitués ces 3 années de thèse.

Je tiens à remercier aussi tout les membres de l'unité Carmen pour toute leur bonne humeur et leur convivialité. Parmi toutes ces personnes, je souhaite remercier plus particulièrement :

Audrey, notre experte ès extraction ARN, dosages miRs & WB... Merci pour toutes les manip's réalisées, toujours dans la bonne humeur malgré le nombre plutôt élevé d'échantillons à traiter, à chaque fois que je venais te voir... C'est pourquoi, j'acceptais de « braver l'interdit » et d'arrêter tes plaques le vendredi soir, pour que tu puisses partir en week-end plus tôt ! Faudra que tu te débrouilles sans moi dorénavant.

Merci également à Vanessa, pour la réalisation express de manip's non planifiées à la dernière minute.

Merci aussi à Annie, exilée depuis peu à Rockefeller pour avoir été dans les deux premières années de ma thèse, mon fournisseur officiel de C2C12 et de m'avoir appris à m'en occuper. Tes conseils m'ont permis de réaliser la culture de nombreuses flasques en simultanée.

Merci à Guillaume aka 'Pipette d'or', pour avoir partagé son expérience de post-doctorant et pour m'avoir donné du boulot jusqu'à la dernière minute avec ses différents muscles de souris.

Merci également à Nadia, pour toutes les discussions cinéphiliques sur les films de la semaine, comme sur les chefs-d'œuvre connus et méconnus du septième Art.

Au tour des doctorants ;

Merci aux anciens M2, devenus doctorants Roméo notre doctorant « métaphysico-ésotéro-philosophico-spirituel » & Pierre notre geek, padawan de la recherche et de la Force (jedi ou sith ? tu n'as jamais vraiment été clair la dessus), pour tous les bons moments passés au labo et en dehors de celui-ci. Courage les jeunes, il vous reste encore une bonne année et demi à tirer !

A notre docteur (médecin) et futur docteur (sciences) Nadir (membre fondateur des 'funky chercheurs'), merci pour les 2-3 jours/semaines de discussions intelligentes qui relevaient un peu le niveau des sujets de conversation du bureau des doctorants.

Merci aussi à notre doctorante véto-biologiste Farah (tu es encore doctorante pour 24h !) pour ta bonne humeur communicative.

Je souhaite également souhaiter un bon courage à la petite dernière, Caroline qui a intégré notre bureau de doctorants, et qui en deux semaines, l'a rendu méconnaissable.

Je souhaite aussi remercier les anciens doctorants qui m'ont accueilli au sein de leur groupe, « pour le meilleur comme pour le pire ». Merci à Clément, chief office<sup>®</sup> autoproclamé et émulsifiant indispensable ; à Joffrey, doctorant de l'Insa (so what ?) toujours là pour donner des conseils pour les manip et pour le rock anglais (désolé mais pour moi, les meilleurs sont les Stones, il n'y a qu'à voir leur dernier titre « Doom & Gloom » !) ; et à Kevin, le co-doctorant moniteur, docteur depuis peu, qui a toujours su mettre la bonne humeur dans le bureau. Etant le dernier à rejoindre cette « strike team » de doctorants, c'est tout naturellement que je suis le dernier à obtenir le titre de docteur, mais bon, on ne va pas se leurrer : on sait tous que c'était moi le meilleur, et qui était le chief office<sup>®</sup>, dans l'ombre !

Cette strike team ne serait rien sans deux personnes, qui n'ont (hélas) pas choisi de faire une thèse, c'est pourquoi vous êtes à part ! Colin à qui on a volontiers laissé une petite place (juste ce qu'il faut, il ne faut pas oublier le grade, ASH, que tu avais !) dans le bureau pour pouvoir utiliser son vieil ordinateur portable qui ramait. Merci pour ta bonne humeur et pour toutes ces soirées organisées à la croix-rousse. Julien notre ingénieur bio-statisticien, que tout le labo s'arrache. Désolé Jujub, mais je vais être le premier à ne pas te remercier pour tes talents de matheux, mais pour ton sens de l'amitié.

Cette liste des remerciements est déjà bien longue, du coup je vais être plus direct :

- merci à tous les membres de l'UFR biologie Génétique d'avoir accepté que je dispense des cours et des travaux pratiques aux 3 années de Licence Génétique. Cela a confirmé mon intérêt pour l'enseignement à l'université.

- comme promis à plusieurs membres du labo, je vais également tenir mes engagements et remercier ma « 206 » qui a assuré de nombreux allers-retours entre la Doua et Lyon sud, parfois le même jour, et ce, quelque soit le temps ...

- merci aussi à AC, IH, JH, PJH, JM, PS, RS, ST, et TW pour leur motivation continuelle au cours de ces trois années.

- Bien évidemment merci à toute ma famille, qui a du penser (selon mes propos) que je ne faisais que cultiver des cellules pendant trois ans et parfois même le week-end. Maintenant vous savez réellement ce que j'ai fait : ce n'était pas aussi confidentiel que je le laissais penser.

*Pour finir, si je devais résumer ces trois années de thèse en trois mots : **manips', café & articles scientifiques**. Et le mélange des trois, surtout dans la dernière ligne droite fut plutôt rock'n roll.*

*Cependant, au vue du résultat de ces trois années de thèse, on ne peut que clamer ; "It's only rock 'n' roll but I like it !"*





# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	15
AVANT-PROPOS.....	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
I DECOUVERTE DES EXOSOMES.....	22
II BIOGENESE DES EXOSOMES.....	23
<i>II.1 Endocytose</i> .....	24
II.1.1 Endocytose dépendante de la clathrine.....	24
II.1.2 Endocytose indépendante de la clathrine.....	26
<i>II.2 Les différents compartiments endosomaux</i> .....	28
II.2.1 Les endosomes précoces.....	30
II.2.2 Les endosomes tardifs et multivésiculaires (MVE).....	32
II.2.3 Les vésicules intraluminales (ILV).....	34
II.2.3.a Biogenèse des ILV.....	35
II.2.3.a.1 Composition lipidique de la membrane des ILV.....	35
II.2.3.a.2 Protéines impliquées dans la formation des ILV.....	37
II.2.3.b Devenir des ILV contenues dans les MVE.....	44
II.2.3.b.1 Dégradation des ILV par les lysosomes.....	44
II.2.3.b.2 Stockage temporaire des ILV et back-fusion.....	45
II.2.3.b.3 Sécrétion des ILV dans le milieu extracellulaire : libération des exosomes.....	45
III LES EXOSOMES.....	48
<i>III.1 Caractéristiques morphologiques et biochimiques</i> .....	48
<i>III.2 Composition des exosomes</i> .....	50
III.2.1 Composition protéique des exosomes.....	50
III.2.2 Composition lipidique des exosomes.....	52
III.2.3 Les carbohydrates.....	54
III.2.4 Composition en acides nucléiques des exosomes.....	54
IV MECANISMES DE CAPTURE DES EXOSOMES PAR LES CELLULES CIBLES.....	57
<i>IV.1 Adhésion des exosomes à la membrane plasmique de la cellule receveuse</i> .....	57
IV.1.1 Interaction spécifique de type « ligand-récepteur ».....	57
IV.1.2 Rôle des tétraspanines.....	58
<i>IV.2 Fusion de la membrane des exosomes à la membrane plasmique</i> .....	60
<i>IV.3 Internalisation des exosomes par la cellule cible</i> .....	60
V ROLES PHYSIOLOGIQUES DES EXOSOMES.....	61
<i>V.1 Régulation de l'expression des gènes</i> .....	62
<i>V.2 Activation directe de voies de signalisation</i> .....	63
<i>V.3 Implication des exosomes dans la prolifération et la différenciation cellulaire</i> .....	64
<i>V.4 Remodelage du stroma cancéreux</i> .....	65
<i>V.5 Régulation de la réponse immunitaire et présentation d'antigènes</i> .....	66
<i>V.6 Transfert de virus et de prions</i> .....	66
<i>V.7 Implication des exosomes dans le développement du diabète de type 2</i> .....	67
VI UTILISATION DES EXOSOMES DANS LA MODULATION DE LA REPOSE CELLULAIRE AUX THERAPIES.....	68



<b>TRAVAUX PERSONNELS .....</b>	<b>70</b>
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....</b>	<b>71</b>
<b>CHAPITRE 1_CHARACTERISATION DES EXOSOMES SECRETES PAR LA CELLULE MUSCULAIRE ET ETUDE DE LEURS ROLES AU COURS DE LA MYOGENESE .....</b>	<b>73</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>74</b>
<b>I Les facteurs protéiques impliqués au cours de la myogenèse.....</b>	<b>74</b>
<b>II Les microARNs (miARNs) impliqués au cours de la myogenèse.....</b>	<b>75</b>
<b>II.1 Rappels sur les miARNs.....</b>	<b>75</b>
<b>II.2 Rôle des miARNs au cours de la myogenèse.....</b>	<b>78</b>
<b>III Modèle d'étude de la myogenèse : le modèle murin C2C12 .....</b>	<b>79</b>
<b>ARTICLE 1 .....</b>	<b>81</b>
<b>ARTICLE 2 .....</b>	<b>82</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>83</b>
<b>I Vérification de la qualité des exosomes isolés .....</b>	<b>83</b>
<b>I.1 Utilisation d'un milieu de culture dépourvu en exosomes du sérum .....</b>	<b>83</b>
<b>I.2 Isolement des exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes.....</b>	<b>85</b>
<b>II Caractérisation du contenu des exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes .....</b>	<b>87</b>
<b>II.1 Caractérisation du contenu protéique.....</b>	<b>87</b>
<b>II.2 Caractérisation du contenu en acides nucléiques .....</b>	<b>89</b>
<b>III Caractérisation du rôle biologique des exosomes sécrétés au cours de la myogenèse .....</b>	<b>91</b>
<b>III.1 Les exosomes régulent la prolifération des myoblastes (résultats article 1).....</b>	<b>91</b>
<b>III.2 Les exosomes sont impliqués dans la différenciation des myotubes .....</b>	<b>92</b>
<b>CHAPITRE 2_ETUDE DES EXOSOMES SECRETES PAR LES CELLULES MUSCULAIRES EN SITUATION D'INSULINO-RESISTANCE INDUITE PAR LE PALMITATE .....</b>	<b>96</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>97</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>100</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>115</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>118</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>140</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>141</b>
<b>I APPAREILS.....</b>	<b>141</b>
<b>II PRODUITS.....</b>	<b>141</b>
<b>III METHODES.....</b>	<b>144</b>
<b>III.1 Culture cellulaire.....</b>	<b>144</b>
<b>III.1.1 Lignées cellulaires musculaires .....</b>	<b>144</b>
<b>III.1.1.a Les cellules musculaires de souris C2C12 .....</b>	<b>144</b>
<b>III.1.1.b Les cellules musculaires de rat L6 .....</b>	<b>144</b>
<b>III.1.2 Modèle <i>in vivo</i> de cellules musculaires.....</b>	<b>145</b>

III.2 Protocoles expérimentaux basés sur les exosomes.....	146
III.2.1 Elimination des exosomes du sérum des milieux de culture.....	146
III.2.2 Isolement des exosomes des milieux conditionnés.....	146
III.2.3 Caractérisation des exosomes.....	147
III.2.3.a Caractérisation morphologique.....	147
III.2.3.a.1 Estimation de la taille des vésicules par granulométrie.....	147
III.2.3.a.2 Microscopie électronique à transmission.....	148
III.2.3.b Caractérisation du contenu.....	148
III.2.3.b.1 Composition protéique.....	148
III.2.3.b.2 Composition en microARNs.....	149
III.2.4 Effets des milieux conditionnés et des exosomes isolés sur les cellules musculaires des lignées C2C12 ou L6.....	149
III.3 Utilisation du palmitate pour induire une insulino-résistance des cellules musculaires.....	150
III.3.1 Préparation du palmitate.....	150
III.3.2 Traitement des C2C12 au palmitate.....	150
III.4 Modulation de l'expression génique.....	151
III.4.1 Répression de la transcription par les siRNAs.....	151
III.4.2 Surexpression protéique par les adénovirus.....	151
III.5 Etude de la régulation transcriptionnelle par les miARNs.....	152
III.5.1 Transfection avec le vecteur contenant la région 3'UTR du gène de la Sirtuin-1.....	152
III.5.2 Dosage de la luciférase.....	154
III.6 Mesure de l'expression génique.....	154
III.6.1 Préparation des ARN.....	154
III.6.2 Reverse transcription et dosages des mRNAs cibles.....	154
III.6.3 Reverse transcription et dosages des miRNAs.....	155
III.7 Mesure de l'expression et quantification protéique par Western-Blot.....	155
III.7.1 Extraction des protéines.....	155
III.7.2 Western-Blot.....	156
III.8 immunofluorescence.....	156
III.9 Mesure de la prolifération cellulaire.....	157

<b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>158</b>
<b><i>I Articles scientifiques.....</i></b>	<b><i>158</i></b>
<b><i>II Communications orales scientifiques.....</i></b>	<b><i>158</i></b>
<b><i>III Posters scientifiques.....</i></b>	<b><i>159</i></b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

## ► A

AAA : ATPase associated with various cellular activities  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : adénosine diphosphate  
AIP1 : actin-interacting protein 1  
Alix : apoptosis-linked gene-2 (ALG2) interacting protein X  
AP : Adaptator protéins  
APC : Antigen presenting cells (cellule présentatrice d'antigène)  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
A-SMase : acide sphingomyelinase  
ATP : adénosine triphosphate  
ATPase : adénosine triphosphatase

## ► B

BMP : bis monoacyl-glycérol phosphate  
Bro1 : BCK1-like resistance to osmotic shock protein-1

## ► C

CD : cluster ou classe de différenciation  
CHMP : charged-multivesicular body proteins  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CMV : cell-derived membrane vesicles  
CRC : cancers colorectaux

## ► D

DED : DMEM Exosome-Depleted  
DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8  
DT2 : diabète de type 2

## ► E

EAP : ELL-associated proteins  
EEF1A1 : eucaryotic elongation factor 1  
EGF : epidermal growth factor  
ELV : exosome-like vesicles  
ERK : Extracellular regulated protein kinase  
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport  
EUR : exosomes uptake receptors

## ► F

FFA : free fatty acid

## ► G

GTPase : guanosine triphosphatase  
GDP : guanosine diphosphate

GPI : glycosyl-phosphatidylinositol  
GTP : guanosine triphosphate

► **H**

HDAC : histone déacétylase  
HRP : horse radish peroxydase  
Hrs : Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate  
HS : horse serum  
Hsc : heat shock cognate  
Hsp : heat shock protein

► **I**

ICAM : intercellular adhesion molecule  
Igf : Insulin growth factor  
IL : Interleukine  
ILV : intraluminal vesicles (vésicules intraluminales)  
IP3 : inositol-triphosphate  
IRS : Insulin Receptor substrate

► **K**

kDA : kiloDalton ( $10^3$  Dalton)

► **L**

LAMP : lysosome associated membrane protein  
LBPA : acide lyso-*bis*-phosphatidique  
LFA-1 : leucocyte function associated antigen  
LMP1 : Latent membrane protein-1

► **M**

MAP : mitogen-activated protein  
MEF2 : Myocyte enhancer factor 2  
MET : microscopie électronique à transmission  
miARN : microARN  
MMP : matrix metalloprotease  
MRE : miRNA Response Element  
MRF : myogenic regulatory factors  
MSE : milieu sans exosomes  
MVB12 : multivesicular body 12  
MVE : multivesicular endosome (endosome multivésiculaire)  
 $\mu\text{m}$  : micromètre

► **N**

nm : nanomètre  
N-SMase : neutral sphingomyelinase

► **P**

PC : phosphatidylcholine  
PE : phosphatidyléthanolamine  
PI3P : phosphatidylinositol 3 phosphate  
PI3,5P2 : phosphatidylinositol-3,5-biphosphate

PI4,5P2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate  
PI3,4,5P3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate  
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase  
PKCζ : protéine kinase C zeta  
PP2A : protéine phosphatase 2A  
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
PS : phosphatidylsérine  
PTRF : polymerase-I transcript release factor

► **R**

Rab : ras-related in brain  
RISC : RNA-induced silencing complex

► **S**

SMS : sphingomyelin synthase  
SNARE : SNAP receptor  
SNAP : soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protéin  
SRF : Serum response factors  
STAM 1/2 : Signal Transducing Adaptor Molecule 1/2  
SVF : serum response factor

► **T**

T2DM : Type 2 diabetes mellitus  
Tim : T-cell Immunoglobulin- and mucin-domain-containing Molecule  
TL : toll-like receptor  
TLDA : TaqMan Low Density Array  
TM4SF : transmembrane 4 superfamily  
TNF : tumor necrosis factor  
TRBP : TAR RNA binding protein  
Tsg101 : tumor susceptibility gene 101

► **U**

UBD : Ubiquitin-Binding Domain  
UTR : untranslated region

► **V**

VE : vésicule extracellulaire  
VIP : vesicular integral membrane protein  
VPS : vacuolar protein sorting

► **W**

wt : wild-type

# LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Les principales populations de vésicules sécrétées par la cellule
- Figure 2** Comparaison des tailles des principales vésicules sécrétées
- Figure 3** Photos de microscopie électronique de corps multivesiculaires contenant le récepteur de la transferrine marqué (*à gauche*). Libération des exosomes suite à la fusion des corps multivesiculaires avec la membrane plasmique (*à droite*)
- Figure 4** La voie endosomale
- Figure 5** Endocytose faisant intervenir la clathrine
- Figure 6** Phagocytose et Macropinocytose
- Figure 7** Mécanisme d'endocytose dépendante de la cavéoline
- Figure 8** Les différentes protéines Rab impliquées dans le système endosomal
- Figure 9** Micrographie des endosomes précoces observés en ME (cellules HeLa). Les endosomes précoces contiennent la protéine transferrine couplée à l'enzyme HRP (horse radish peroxydase)
- Figure 10** Devenir du contenu de la vésicule d'endocytose après le tri dans l'endosome précoce
- Figure 11** Endosome tardif de cellules HeLa observé en ME
- Figure 12** pH intraluminal de l'endosome précoce et tardif
- Figure 13** Endosome multivesiculaire de cellule épithéliale de *D. melanogaster* observé en ME
- Figure 14** Vésicules intraluminales dans un endosome précoce (micrographie d'observation ME)
- Figure 15** Les différentes protéines de la famille ESCRT impliquées dans la biogenèse des ILV
- Figure 16** Structure des tétraspanines
- Figure 17** Exemple d'interactions protéiques d'un réseau de tétraspanines
- Figure 18** Les trois devenir possibles des ILV décrites à ce jour et qui sont détaillées dans le texte
- Figure 19** Les trois mécanismes de dégradation du contenu des MVE par les lysosomes, décrits à ce jour
- Figure 20** Sécrétion des exosomes suite à la fusion du MVE à la membrane plasmique
- Figure 21** Exosomes de cellules musculaires murine de C2C12 observés en ME (*coloration négative*)
- Figure 22** Liste des protéines retrouvées de façon ubiquitaire dans les exosomes
- Figure 23** Les différentes formes de miRNAs extracellulaires décrites à ce jour

- Figure 24** Mécanismes possibles d'entrée des exosomes par la cellule cible
- Figure 25** Sécrétion des myokines par le muscle strié squelettique
- Figure 26** Les principales protéines impliquées au cours de la myogenèse strié squelettique
- Figure 27** Les différentes étapes de la biogenèse des microARNs
- Figure 28** Expression différentielle des principaux miARNs au cours de la différenciation
- Figure 29** Les principales protéines régulées par les miARNs au cours de la myogenèse
- Figure 30** Les trois fractions de milieux conditionnés des myoblastes et des myotubes utilisés
- Figure 31** La voie de signalisation de l'insuline
- Figure 32** Impact des céramides intracellulaires
- Figure 33** Implication des céramides dans la biogenèse des exosomes et dans l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline
- Figure 34** Phosphorylation de la PKB dans les myotubes C2C12 pour différentes concentrations et temps de traitement au palmitate
- Figure 35** Maintien de l'altération de la phosphorylation de la PKB après le traitement au palmitate
- Figure 36** Effet des milieux conditionnés complets
- Figure 37** Effet des milieux conditionnés dépourvu en exosomes
- Figure 38** Effet des exosomes sécrétés
- Figure 39** 16 semaines de diète enrichie en palmitate (20%) induisent une insulino-résistance chez la souris
- Figure 40** Caractérisation des exosomes sécrétés par la cellule musculaire rendue insulino-résistante par du palmitate
- Figure 41** Convergence des voies de biogenèse des exosomes et de la translocation des vésicules GluT4

# LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Les principales protéines Rab impliquées dans la voie endosomale (*liste non exhaustive*)
- Tableau 2** Les protéines de la famille ESCRT, leurs interactions et leurs fonctions au cours de l'invagination de la membrane de l'endosome multivésiculaire
- Tableau 3** Protéines de la famille des Tétraspaines et leurs interactions protéiques connues à ce jour (*liste non exhaustive*)





# **AVANT-PROPOS**

Toutes les cellules reçoivent et émettent des messages, en provenance ou vers le monde extérieur et les autres cellules. Ces divers messages conditionnent l'existence de la cellule et ses relations avec le milieu environnant. Ils déclenchent dans la cellule réceptrice des réactions biochimiques importantes telles que la régulation de voies métaboliques essentielles ou encore des mécanismes cellulaires tels que la sécrétion, la contraction .....

Chez les vertébrés, en particulier, on trouve parmi les vecteurs essentiels de messages vers les cellules, les hormones. L'insuline est la principale hormone responsable de la régulation du métabolisme glucidique et du maintien de la glycémie. Sécrétée par le pancréas, elle favorise le passage du glucose à travers les membranes et son stockage à l'intérieur des cellules, en particulier dans le muscle squelettique. Elle joue aussi un rôle important dans le contrôle d'autres processus métaboliques comme la synthèse et l'oxydation des acides gras, la lipolyse, l'absorption des acides aminés et la synthèse des protéines. En plus de ce rôle métabolique fondamental, l'insuline peut aussi agir comme facteur de croissance et comme régulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose dans divers types cellulaires. La plupart des tissus de l'organisme (foie, cœur, tissu adipeux, muscles, cellules endothéliales, tissus endocrines) sont des cibles de cette hormone.

Plusieurs pathologies importantes, comme le diabète de type 2 et l'obésité, sont associées à un défaut d'action de l'insuline dans ses tissus cibles. Cette anomalie, appelée insulino-résistance, est une des causes de l'hyperglycémie du diabète de type 2 et est le principal facteur de risque de maladies cardiovasculaires chez ces patients ainsi que chez les sujets obèses. Des travaux antérieurs du laboratoire avaient démontré que dans le muscle squelettique, l'insulino-résistance se traduisait par une altération de l'expression des gènes et d'un certain nombre de microARNs. En parallèle, des travaux publiés au début de ce travail de thèse

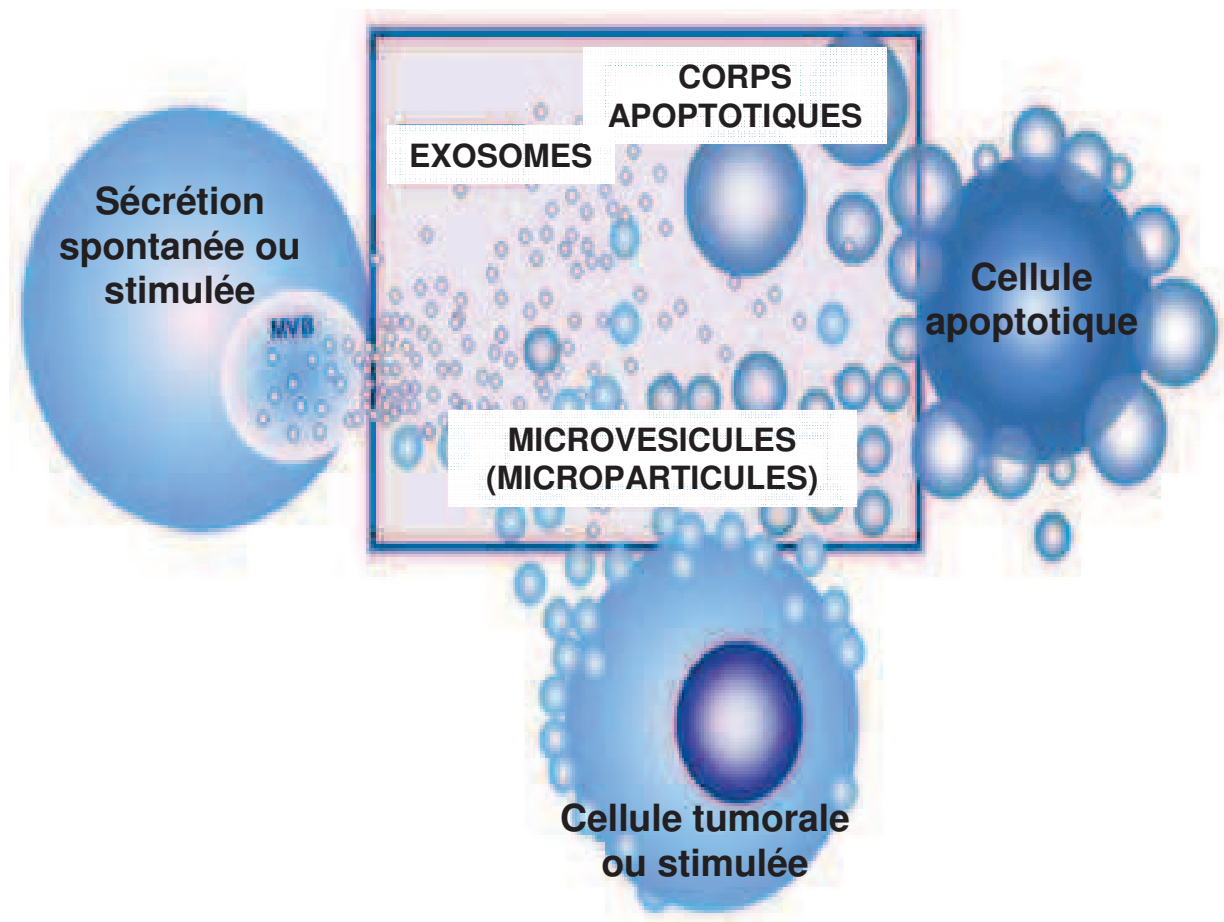
indiquaient que l'on pouvait retrouver des microARNs à l'extérieur des cellules, dans tous les fluides biologiques, associés à des vésicules (comme les exosomes). Il s'est donc posé la question du rôle biologique de ces microARNs. En effet, d'autres travaux indiquaient que les microARNs circulants pouvaient être captés et régulaient « à distance » le génome d'autres cellules au sein du même tissu ou entre tissus différents. L'insulino-résistance musculaire précédant le développement du diabète, il est actuellement postulé que le muscle sécréterait un message moléculaire (des cytokines spécifiques, les myokines) qui serait capable de moduler l'homéostasie d'autres organes, et qui serait à l'origine de l'altération de la sécrétion d'insuline par le pancréas, conduisant à un état diabétique.

Au cours de ce travail de thèse nous avons voulu démontrer que **les exosomes** faisaient partie de ce message moléculaire et que les microARNs contenus dans ces exosomes y participaient. Nous avons axé notre travail sur l'étude des exosomes sécrétés par le muscle squelettique en situation normale, au cours de la différenciation musculaire. Puis nous avons abordé l'étude de la composition des exosomes au cours d'une insulino-résistance induite par du palmitate.

Ce manuscrit est divisé en trois parties. La première partie est une introduction bibliographique rappelant la biogenèse, la composition et les rôles biologiques des exosomes établis à ce jour. La seconde partie est consacrée aux travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse, qui ont permis l'écriture de deux articles, intégrés dans cette partie. Dans une dernière partie nous discutons des perspectives entrouvertes par ce travail. Un descriptif du matériel et méthodes se trouve en annexe.

# **INTRODUCTION**

# **BIBLIOGRAPHIQUE**

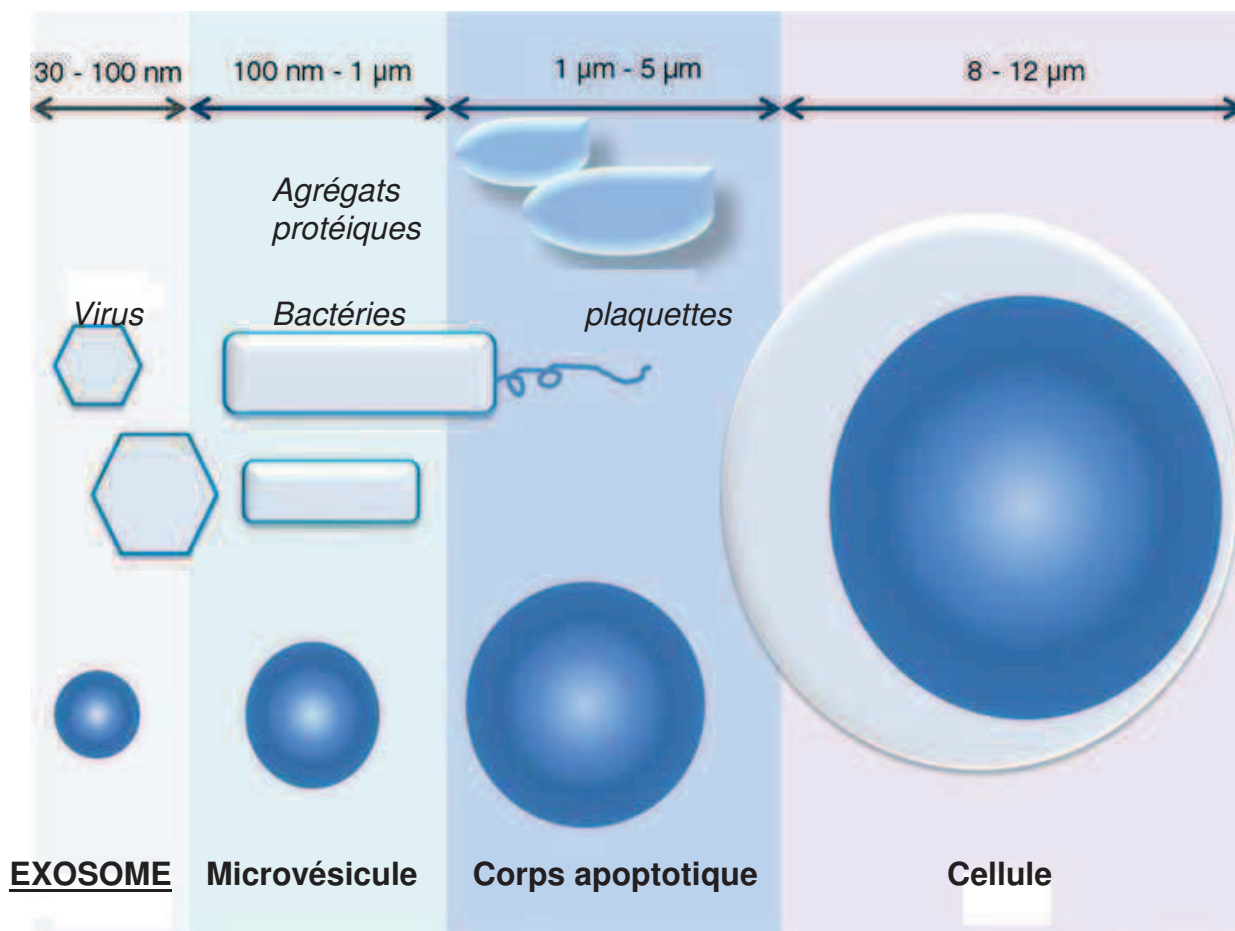


**Figure 1** Les principales populations de vésicules sécrétées par la cellule (exosomes, microvésicules et corps apoptotiques)  
*d'après György et al. 2011*

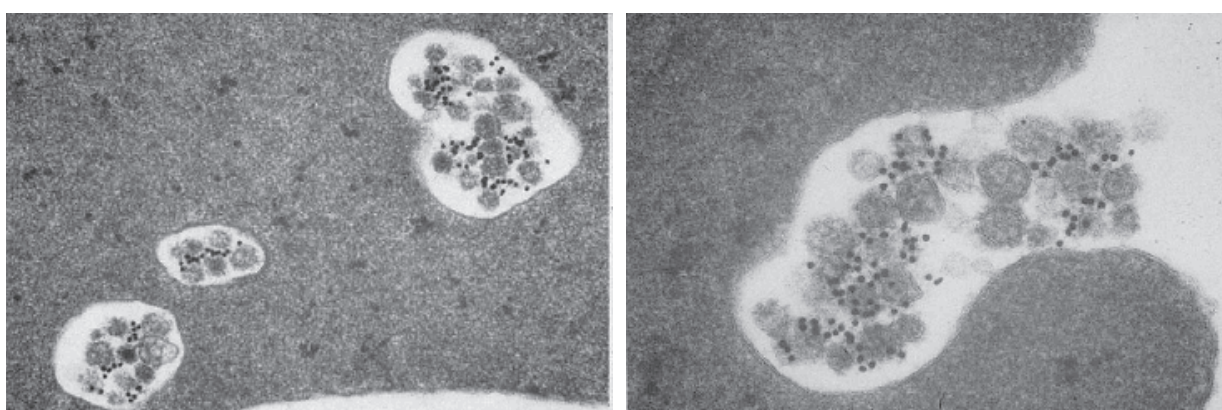
# LES EXOSOMES

Les cellules sécrètent une population hétérogène de vésicules dans le milieu extracellulaire : exosomes, corps apoptotiques, vésicules en bourgeonnement, microparticules/ectosomes, prostasomes, tolérosomes, prominosomes...) (Keller, Sanderson et al. 2006; Simpson, Jensen et al. 2008; Cocucci, Racchetti et al. 2009; Gyorgy, Szabo et al. 2011; Morel, Jesel et al. 2011; van Dommelen, Vader et al. 2012; Vlassov, Magdaleno et al. 2012) (Figures 1 et 2). La classification de ces différentes vésicules repose sur leurs propriétés morphologiques (taille, densité), leurs mécanismes de biogenèse, leurs propriétés fonctionnelles ainsi que sur le type et le statut physiopathologique des cellules qui les sécrètent (cellules différenciées, en situation de stress, stimulées, transformées...) (Mathivanan, Ji et al. 2010; Quesenberry and Aliotta 2010; Pant, Hilton et al. 2012; Vlassov, Magdaleno et al. 2012). La composition protéique de ces différentes populations de vésicules permet de les caractériser et de les différencier (par exemple, les histones ne sont retrouvées que dans les corps apoptotiques tandis que les tétraspanines sont spécifiquement associées aux exosomes) (Thery, Ostrowski et al. 2009). Comme ces différentes populations de vésicules sont libérées dans le milieu extracellulaire, d'autres cellules peuvent être exposées à leur contenu luminal, qui reflète l'état physiologique de la cellule qui les sécrète (Bang and Thum 2012; Lee, El Andaloussi et al. 2012).

Le terme « exosome » provient de la contraction de deux mots d'origine grecque : 'exô' (hors de) et 'sôma' (le corps). Depuis leur découverte dans les années 80, les exosomes suscitent un intérêt grandissant : sur PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed>), le nombre de publications répertoriées est passé de 5 articles référencés entre 1980 et 1989 à 38 publications



**Figure 2** Comparaison des tailles des principales vésicules sécrétées  
d'après György et al. 2011



**Figure 3** Photos de microscopie électronique de corps multivesiculaires contenant le récepteur de la transferrine marqué (à gauche). Libération des exosomes suite à la fusion des corps multivesiculaires avec la membrane plasmique (à droite)  
d'après Johnstone 2005

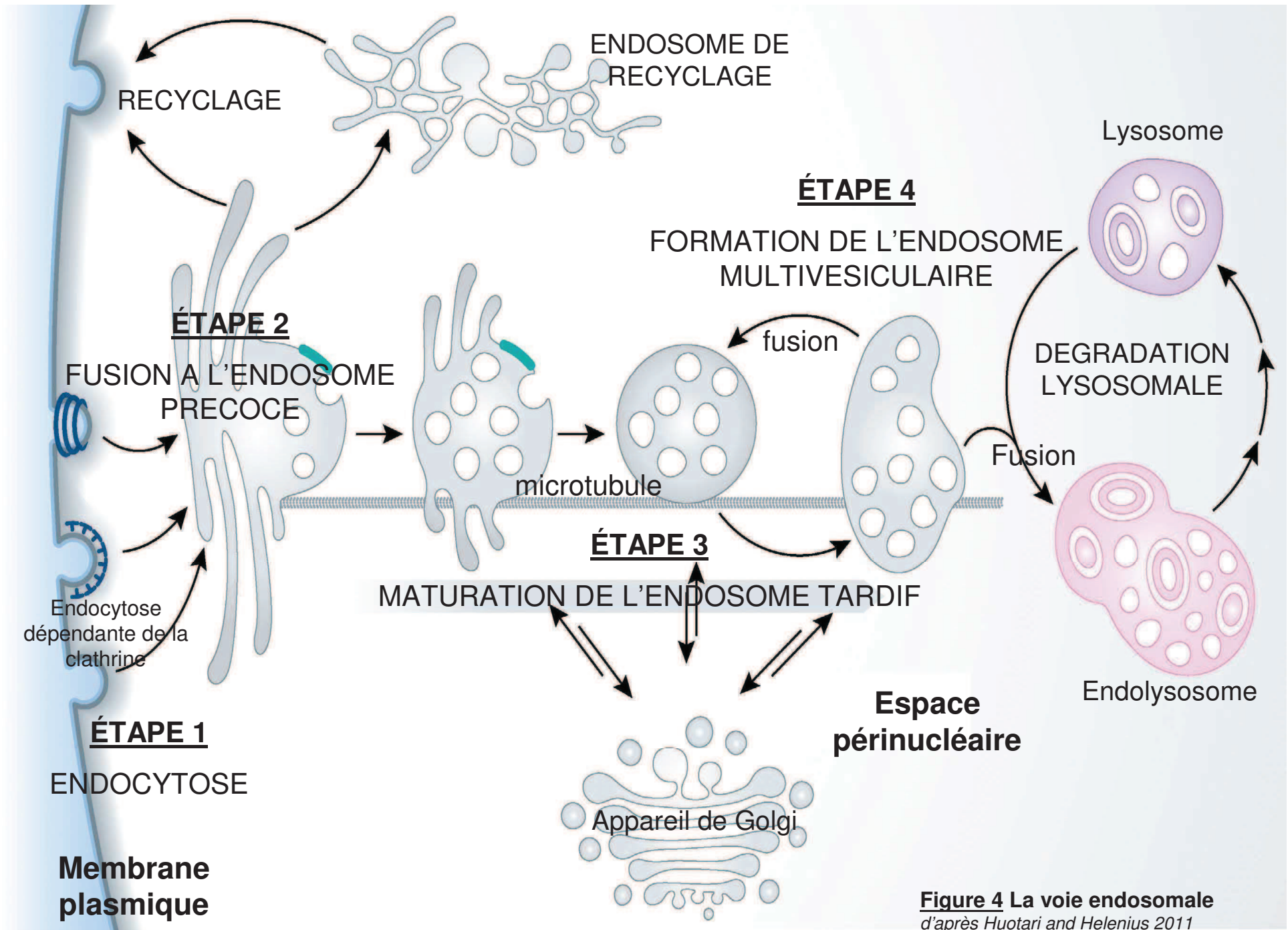


(dont 6 revues scientifiques) dans les années 90, puis à 888 publications (dont 164 revues scientifiques) entre 2000 et 2010 et à 745 publications (dont 126 revues scientifiques) entre 2010 et 2012. Préalablement considérés comme transporteurs des déchets cellulaires (élimination des protéines mal conformées ou obsolètes), les exosomes sont de plus en plus considérés comme des vésicules intervenant dans la communication intercellulaire et dans les processus immunologiques de présentation d'antigènes (Thery, Ostrowski et al. 2009; Pegtel, Cosmopoulos et al. 2010; Gyorgy, Szabo et al. 2011; Pant, Hilton et al. 2012).

Les exosomes sont sécrétés par tous les types cellulaires (mastocytes, lymphocytes, cellules dendritiques, plaquettes, adipocytes, réticulocytes, astrocytes, neurones, cellules épithéliales....) (Raposo, Nijman et al. 1996; Heijnen, Schiel et al. 1999; Thery, Regnault et al. 1999; van Niel, Raposo et al. 2001; Blanchard, Lankar et al. 2002; Fevrier and Raposo 2004; Laulagnier, Motta et al. 2004; Aoki, Jin-no et al. 2007; Valadi, Ekstrom et al. 2007; Zhou, Li et al. 2012). De ce fait, ils sont présents dans les différents systèmes circulatoires et peuvent être isolés à partir de nombreux fluides biologiques (sérum/plasma, urine, bile, lavage broncho-alvéolaire, lait maternel, ascites, liquide céphalorachidien, liquide épидидymal et séminal, liquide pleural, liquide amniotique, salive...) (Caby, Lankar et al. 2005; Keller, Sanderson et al. 2006; Conde-Vancells, Rodriguez-Suarez et al. 2008; Thery, Ostrowski et al. 2009; Masyuk, Huang et al. 2010; Rupp, Rupp et al. 2011; Thery 2011; Eldh, Lotvall et al. 2012; Henderson and Azorsa 2012; Hu, Drescher et al. 2012; Vlassov, Magdaleno et al. 2012; Zhou, Li et al. 2012).

## **I Découverte des exosomes**

Initialement décrite par l'équipe de Trams comme une « expansion » de la membrane plasmique (Trams, Lauter et al. 1981) puis par Harding et Stahl (Harding, Heuser et al. 1983), la notion d'exosomes est apparue au cours des années 80, période pendant laquelle l'équipe de R. Johnstone étudiait le devenir du récepteur de



**Figure 4** La voie endosomale  
d'après Huotari and Helenius 2011

la transferrine (TfR) lors de la différenciation des réticulocytes de mouton en érythrocytes. Protéine majoritaire de la membrane plasmique des réticulocytes, le devenir de ce récepteur a été suivi grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à des billes d'or colloïdal. En microscopie électronique (ME) il a été observé un phénomène d'endocytose de la protéine membranaire, suivi d'une concentration croissante du marquage au sein de vésicules présentes dans un compartiment endosomal dont la taille augmentait au fur et à mesure que des vésicules marquées apparaissaient. Enfin, la fusion de cet endosome avec la membrane plasmique aboutissait à la libération, dans le milieu extracellulaire, du marquage spécifique de la protéine d'intérêt au sein de nanovésicules d'un diamètre moyen de 50 nanomètres (Figure 3) (Johnstone, Adam et al. 1987; Johnstone, Bianchini et al. 1989; Johnstone 2005; Johnstone 2006).

## II Biogenèse des exosomes

L'analyse de la composition protéique des exosomes révèle que leur biogenèse est liée aux différentes étapes de la maturation des endosomes. Aucune protéine d'origine nucléaire, mitochondriale, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi n'a été retrouvée au sein des exosomes, confirmant ainsi leur origine endosomale (Thery, Zitvogel et al. 2002).

Dans un premier temps, nous allons décrire les différentes étapes du système de formation des endosomes (Figure 4). Un processus cellulaire appelé « endocytose », permet la capture et l'internalisation de différentes macromolécules présentes dans le milieu extérieur et/ou dans la membrane plasmique (étape 1 de la Figure 4). Les molécules internalisées sont ensuite dirigées vers les différents compartiments endosomaux qui sont interconnectés entre eux : l'endosome précoce (étape 2 de la figure 4) va subir un processus de maturation pour devenir l'endosome tardif (étape 3 de la Figure 4) qui sera à l'origine de l'endosome multivésiculaire (MVE) (étape 4 de la Figure 4). La fusion des MVE aux lysosomes aboutit à la

dégradation du contenu endosomal, tandis que la fusion des MVE à la membrane plasmique permet la libération de leur contenu, les vésicules intraluminales qui prennent le nom d'exosomes dans le milieu extérieur (Huotari and Helenius 2011; Ludwig and Giebel 2012).

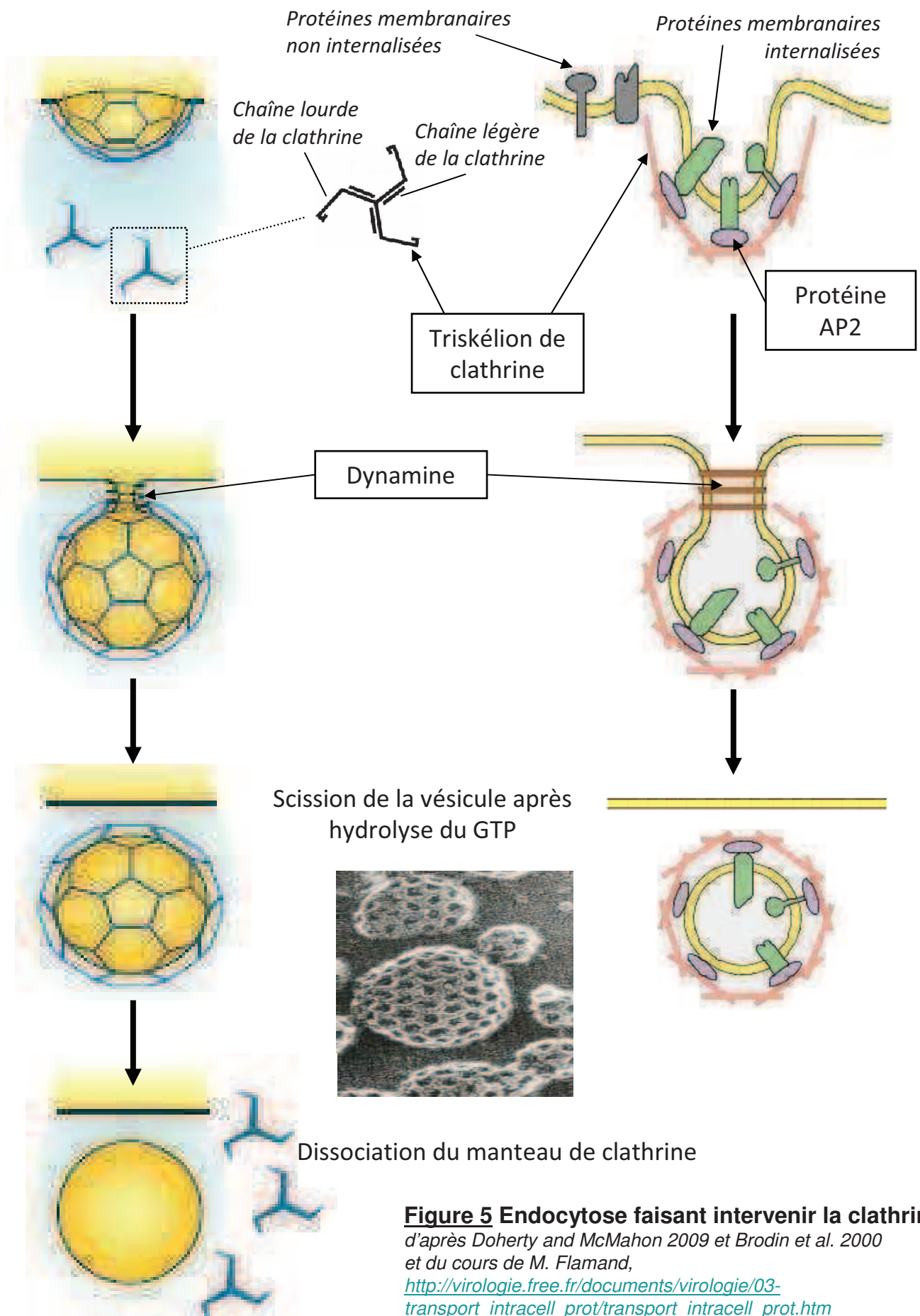
## **II.1 Endocytose**

L'endocytose (grec endon (dedans) et kutos (cellule)) est le mécanisme de transport de molécules voire de particules (virales, bactériennes, etc.) vers l'intérieur de la cellule. Elle permet l'interaction de la cellule avec le milieu extracellulaire (capture des nutriments, signalisation cellulaire...) et aboutit à l'internalisation de composants membranaires (protéines, récepteurs complexés à leur ligand, lipides, macromolécules, pathogènes) par l'invagination de la membrane plasmique, conduisant à la formation de vésicules d'endocytose (première étape du système endosomal) (étape 1 de la Figure 4) (Falguieres, Luyet et al. 2009).

Plusieurs mécanismes d'endocytose sont décrits et coexistent au sein des cellules: l'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine. Quel que soit le mécanisme en jeu, l'endocytose est basée sur la bonne coordination entre des protéines impliquées dans la modification et la courbure de la membrane plasmique, et dans la scission de la vésicule d'endocytose de la membrane. Le mécanisme d'endocytose le mieux décrit est celui mettant en jeu la clathrine (Bishop 2003).

### **II.1.1 Endocytose dépendante de la clathrine**

Observée pour la première fois en ME dans les années 60, Roth et Porter ont remarqué des structures denses aux électrons à la base de vésicules en cours d'internalisation (Roth and Porter 1964). Ce n'est qu'en 1975 que la clathrine, un hétérodimère constitué d'une chaîne lourde (180 kDa) et d'une chaîne légère (30

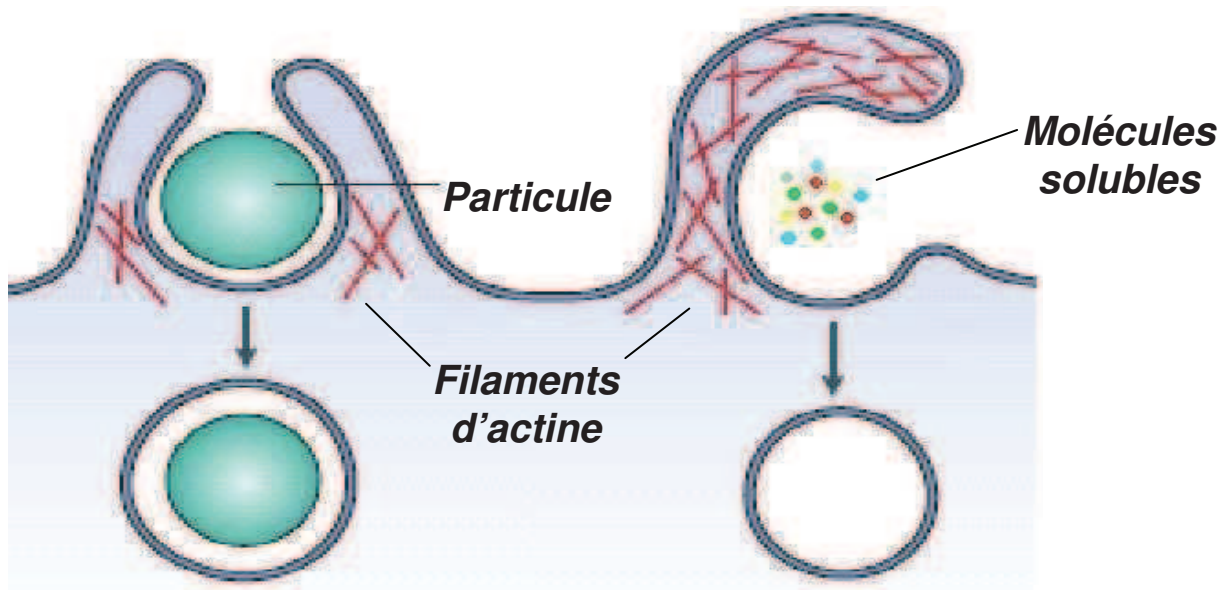


**Figure 5 Endocytose faisant intervenir la clathrine**  
 d'après Doherty and McMahon 2009 et Brodin et al. 2000  
 et du cours de M. Flamand,  
[http://virologie.free.fr/documents/virologie/03-transport\\_intracell\\_prot/transport\\_intracell\\_prot.htm](http://virologie.free.fr/documents/virologie/03-transport_intracell_prot/transport_intracell_prot.htm)  
 sur le « transports intracellulaires des protéines »

kDa) (Figure 5) sera identifiée par Pearse (Pearse 1975). Présent sous forme de trimère (appelé triskélium) dans le cytosol de la cellule, l'hétérotrimère de clathrine va constituer une structure tridimensionnelle formant ainsi une sorte de « cage » qui va englober les vésicules membranaires lors de leur internalisation (Crowther and Pearse 1981; Kirchhausen 2000).

L'association de plusieurs triskéliums de clathrine autour de la vésicule nécessite toutefois la présence d'autres protéines cytosoliques (Pearse and Robinson 1984) comme les complexes hétérotétramériques AP (Adaptator Protein) qui comprennent quatre membres (AP1 à AP4). Seule AP2 est connue pour être présente à la membrane plasmique et être associée aux puits recouverts de clathrine (Robinson 1987; Ahle, Mann et al. 1988). AP2 possède quatre sous-unités dont la sous-unité  $\mu 2$  qui reconnaît et interagit avec deux principaux motifs (tyrosine et dileucine) présents sur les protéines membranaires destinées à être internalisées (Ohno, Stewart et al. 1995). Après la reconnaissance de ces motifs, les protéines membranaires sont concentrées au niveau de « puits » recouverts de clathrine (Conner and Schmid 2003). L'invagination de la membrane plasmique va ainsi s'effectuer, mais la scission de cette vésicule en formation, du reste de la membrane plasmique, nécessite l'intervention d'une autre protéine membranaire, la dynamine (De Camilli, Takei et al. 1995). Cette protéine, qui est une GTPase (guanosine triphosphatases) de 100kDa, va s'enrouler sous forme de multimère autour du « cou » reliant la vésicule à la membrane plasmique. Après hydrolyse du GTP, par l'action enzymatique de la dynamine, la vésicule d'endocytose néoformée est libérée de façon irréversible à l'intérieur de la cellule (Figure 5) (Doherty and McMahon 2009).

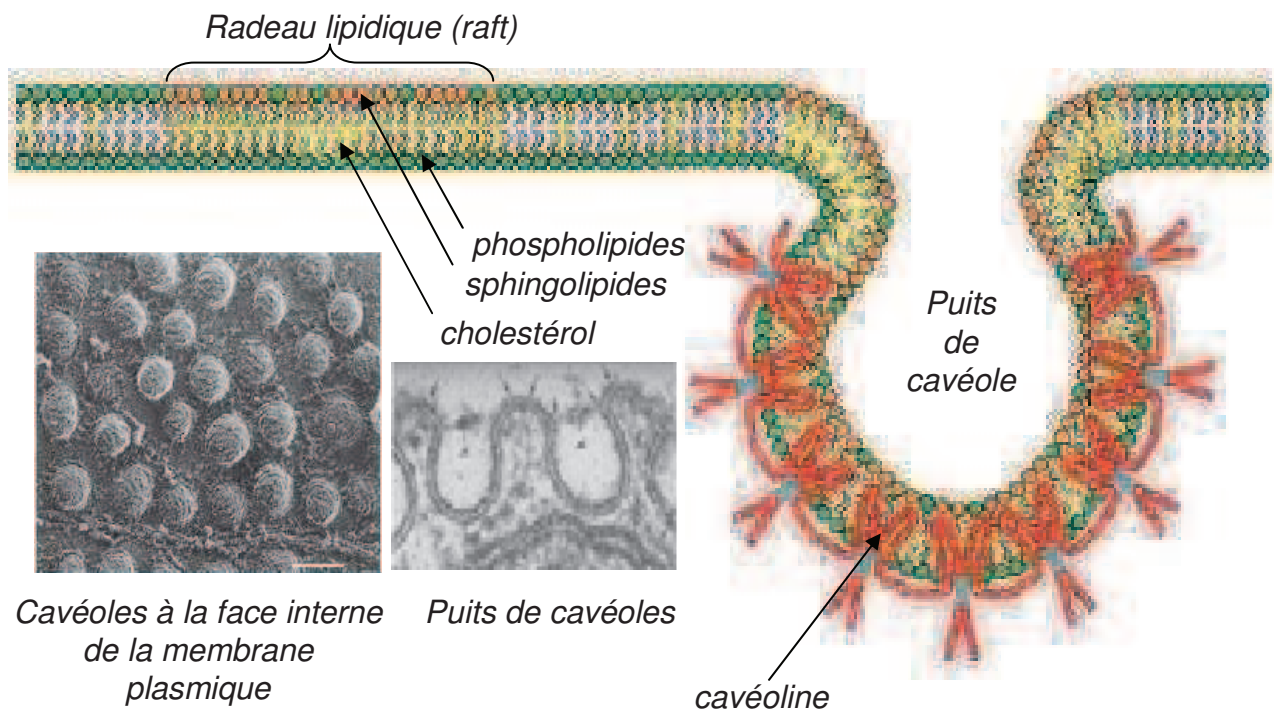
La dissociation du manteau de clathrine de la vésicule d'endocytose s'effectue moins d'une minute après la scission de la vésicule de la membrane plasmique et se produit grâce à l'action conjointe de la protéine chaperonne Hsc70 (heat shock cognate) et d'un cofacteur, l'auxiline (Ungewickell, Ungewickell et al. 1995; Holstein, Ungewickell et al. 1996; Ungewickell, Ungewickell et al. 1997; Hurley and Hanson 2010). De par son activité ATPase couplée à l'action de l'auxiline, Hsc70 va hydrolyser de l'ATP en ADP, induisant ainsi la libération des triskéliums de clathrine dans le cytosol, devenant disponible pour un nouveau processus d'endocytose



## PHAGOCYTOSE

## MACROPINOCYTOSE

**Figure 6** Phagocytose et Macropinocytose  
d'après Mayor and Pagano 2007



## Figure 7 Mécanisme d'endocytose dépendante de la cavéoline

d'après « The Role of Caveolae and the Caveolins in Mammalian Physiology » (Dr. Razani and Dr. Michael, [http://www.ruf.rice.edu/~rur/issue1\\_files/razani.html](http://www.ruf.rice.edu/~rur/issue1_files/razani.html)) et <http://www.stonybrook.edu/biochem/BIOCHEM/facultypages/brown/>).  
La photo de ME est issue de <http://www.dartmouth.edu/~radustan/projects.html>.

(Jiang, Gao et al. 2000). Une fois libérée de son manteau de clathrine, la vésicule d'endocytose fusionne avec l'endosome précoce.

## **II.1.2 Endocytose indépendante de la clathrine**

Plusieurs études ont démontré que le processus d'endocytose était toujours possible malgré le blocage de l'assemblage de la clathrine par l'utilisation de différents inhibiteurs des protéines impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Damke, Baba et al. 1995; Benmerah, Bayrou et al. 1999). Ainsi, la mesure de marqueurs (comme la peroxydase de Raifort, HRP horse radish peroxydase) couplés à des protéines internalisées, en présence d'inhibiteurs du processus d'endocytose dépendante de la clathrine, conduit à une réduction et non une abolition de l'endocytose (Doherty and McMahon 2009). De plus, des observations en ME montrent la présence de puits d'endocytose non recouverts du manteau de clathrine (Huet, Ash et al. 1980).

Plusieurs mécanismes d'endocytose indépendante de la clathrine sont à ce jour décrits, comme la phagocytose, réalisée par les macrophages et qui permet l'internalisation des grosses particules (Figure 6) (Doherty and McMahon 2009) ; la macropinocytose, qui aboutit à la formation de vésicules de tailles et de formes hétérogènes et qui est essentiellement retrouvée dans les cellules tumorales, dans les cellules présentatrices d'antigènes ou encore dans l'internalisation de bactéries et virus par les macrophages (Figure 6) (Watts 1997; Honda, Nogami et al. 1999; Marechal, Prevost et al. 2001; Watarai, Derre et al. 2001). Un processus d'endocytose, qui met en jeu les protéines Flotilline 1 et 2, est également décrit (Doherty and McMahon 2009)

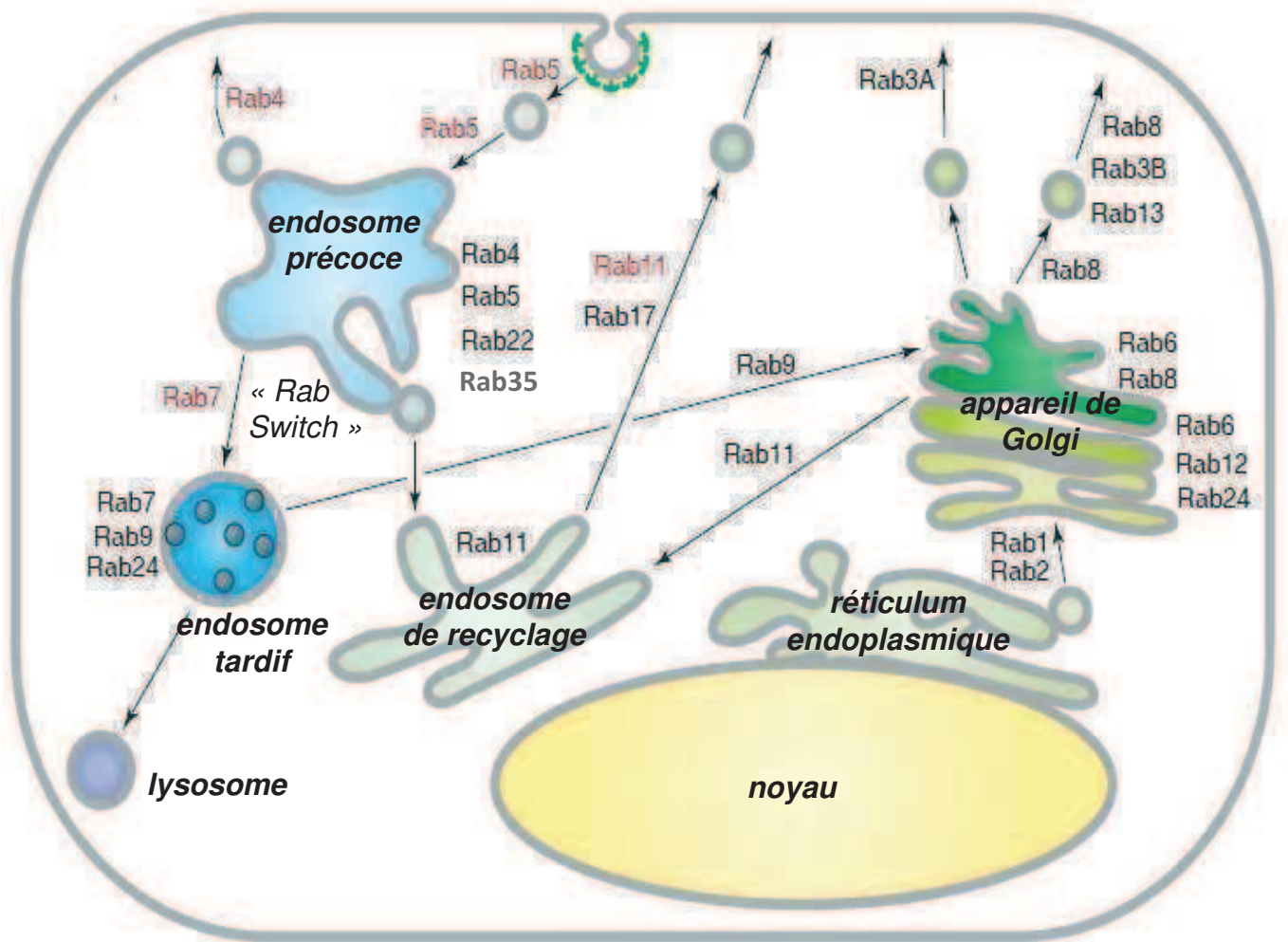
Au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique (les « rafts »), un autre mécanisme d'endocytose indépendante de la clathrine a été décrit. Observé en 1953 en ME (Palade 1955; Williams and Lisanti 2004), les cavéoles sont des vésicules de 50 à 100 nanomètres abondamment retrouvées à la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires (Doherty and McMahon 2009; Hansen and



Nichols 2010). La caractérisation de ces vésicules a été facilitée en 1992 avec l'identification de la protéine impliquée, la cavéoline (ou VIP(21) vesicular integral membrane protein) par l'équipe de Rothberg (Figure 7) (Rothberg, Heuser et al. 1992). Les puits de cavéoles (caveolae) sont formés au niveau des rafts qui sont enrichis en cholestérol, glycosphingolipides et sphingomyéline. Ces microdomaines correspondent à environ 1/3 de la surface de la membrane plasmique. L'abondance des cavéoles suggère un rôle important dans la transduction du signal (Simons and Toomre 2000; Galbiati, Razani et al. 2001; Williams and Lisanti 2004), en plus de leur rôle dans le renouvellement lipidique et protéique de la membrane (McNally, de Sa Moreira et al. 1998).

Trois isoformes de la cavéoline sont décrits chez les mammifères (cavéolines 1 à 3). Les cavéolines 1 et 2 sont retrouvées préférentiellement dans les cellules non musculaires (Doherty and McMahon 2009; Hurley and Hanson 2010) tandis que la cavéoline 3 (ou M-cavéoline) est l'isoforme spécifique des cellules musculaires cardiaques et striées squelettiques (McNally, de Sa Moreira et al. 1998). Les cavéolines sont enrichies dans les cavéoles (entre 100 à 200 molécules par cavéoles) et semblent nécessaires à leur formation (Williams and Lisanti 2004; Doherty and McMahon 2009; Hansen and Nichols 2010; Hurley and Hanson 2010).

La cavéoline 1 est l'isoforme la mieux décrite. Il a été montré qu'elle pouvait se polymériser (oligomères de 14 à 16 monomères), être palmitoylée, se lier aux acides gras (glycosphingolipides) et au cholestérol enrichis au niveau de la membrane plasmique, à l'endroit où les puits de cavéoles sont formés (Doherty and McMahon 2009). Si la cavéoline 1 semble permettre la courbure de la membrane plasmique lors du processus d'endocytose, une seconde famille de quatre protéines est également impliquée dans le processus d'endocytose : les cavines (1 à 4) (anciennement PTRF, polymerase-I transcript release factor) (Vinten, Voldstedlund et al. 2001; Vinten, Johnsen et al. 2005; Doherty and McMahon 2009; Hansen and Nichols 2010). L'isoforme 1 est exprimé par tous les types cellulaires et, à l'instar de la cavéoline 1, la cavine 1 est la forme majoritaire dans les vésicules. La protéine cavine 4 est uniquement exprimée par les cellules musculaires (Hansen and Nichols 2010). Le rôle des autres isoformes est mal connu et n'est pas encore décrit à ce jour. La corrélation entre le taux de protéines cavéoline 1-cavine 1 et l'abondance de



**Figure 8** Les différentes protéines Rab impliquées dans le système endosomal  
*d'après Gaborik and Hunyady 2004*

la formation des cavéoles a été démontrée (Vinten, Johnsen et al. 2005; Doherty and McMahon 2009; Hansen and Nichols 2010).

Après l'invagination de la membrane plasmique par les complexes cavéolines-cavines associés à l'actine, la GTPase dynamine 2 est recrutée par la protéine cavéoline 1 et permet le détachement des cavéoles de la membrane plasmique (Hansen and Nichols 2010). Les cavéoles gardent ensuite leur manteau de cavéolines et de cavines et rejoignent la voie endosomale, en fusionnant avec les endosomes précoces (Pelkmans, Burli et al. 2004; Doherty and McMahon 2009; Hansen and Nichols 2010).

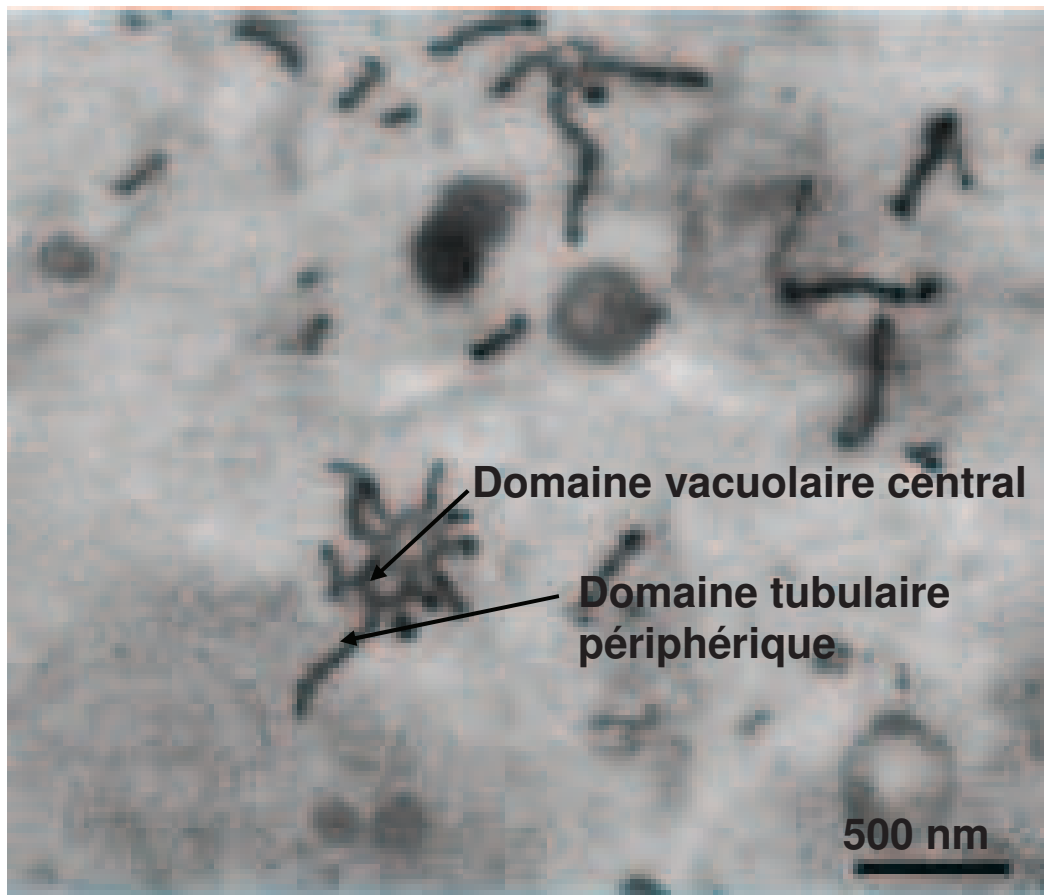
## **II.2 Les différents compartiments endosomaux**

Les différents compartiments endosomaux décrits dans la littérature sont : les endosomes précoces, les endosomes de recyclage, les endosomes tardifs et les endosomes multivésiculaires (Figure 4) (Platta and Stenmark 2011). Les GTPases Rab (Ras-related in brain) sont des protéines clef dans le trafic membranaire de la voie endosomale et sont utilisées comme marqueurs pour distinguer ces différents compartiments endosomaux (Figure 8 et Tableau 1). Environ 70 protéines Rab ont été identifiées chez l'homme. Ces protéines sont organisées en domaines, à la membrane des différents compartiments endosomaux (Zerial and McBride 2001; Fader, Savina et al. 2005). Elles alternent entre un état actif ou inactif selon leurs associations respectives au GTP ou au GDP (Stenmark 2009). Ces protéines ont des rôles importants au cours des différentes étapes du trafic vésiculaire : en association avec des protéines accessoires, elles régulent le bourgeonnement vésiculaire, le transport, la motilité, l'accrochage et la fusion des vésicules formées à la membrane des compartiments cibles (Mills, Jones et al. 1999; Stenmark 2009). Les protéines Rab4, Rab5 et Rab11 sont associées aux endosomes précoces (Bucci, Parton et al. 1992; van der Sluijs, Hull et al. 1992; Daro, van der Sluijs et al. 1996; Ullrich, Reinsch et al. 1996; Stenmark 2009) tandis que les protéines Rab7 et Rab9 sont retrouvées à la membrane des endosomes tardifs (Figure 8 et Tableau 1). (Lombardi, Soldati et al. 1993; Papini, Satin et al. 1997; Soldati and Schliwa 2006; Stenmark 2009).

**Tableau 1 Les principales protéines Rab impliquées dans la voie endosomale (liste non exhaustive)**

Protéines Rab	Localisation dans la voie endosomale	Fonctions cellulaires
<b>Rab4a</b> <b>Rab4b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vésicules d'endocytose reouvertes de clathrine</li> <li>• Endosome précoce</li> <li>• Endosome de recyclage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recyclage des molécules internalisées lors de l'endocytose</li> <li>• Trafic des vésicules GluT4</li> </ul>
<b>Rab5a</b> <b>Rab5b</b> <b>Rab5c</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Membrane plasmique</li> <li>• Vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine</li> <li>• Endosome précoce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biogenèse et fusion des endosomes précoces</li> <li>• Trafic des vésicules GluT4</li> </ul>
<b>Rab7a</b> <b>Rab7b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome tardif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maturation de l'endosome précoce en endosome tardif</li> <li>• Transport vésiculaire entre l'endosome tardif et l'appareil de Golgi</li> <li>• Fusion aux lysosomes</li> </ul>
<b>Rab8</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome de recyclage</li> <li>• Appareil de Golgi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport vésiculaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique</li> <li>• Transport vésiculaire entre l'endosome de recyclage et l'appareil de Golgi</li> <li>• Trafic des vésicules GluT4</li> </ul>
<b>Rab9a</b> <b>Rab9b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome tardif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport vésiculaire entre l'endosome tardif et l'appareil de Golgi</li> </ul>
<b>Rab11a</b> <b>Rab11b</b> <b>Rab11c (Rab25)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome de recyclage</li> <li>• Appareil de Golgi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recyclage des molécules internalisées lors de l'endocytose</li> <li>• Transport vésiculaire entre l'endosome de recyclage et la membrane plasmique</li> <li>• Trafic des vésicules GluT4</li> </ul>
<b>Rab13</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome de recyclage</li> <li>• Appareil de Golgi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport vésiculaire entre l'endosome de recyclage et l'appareil de Golgi (<i>cellules épithéliales</i>)</li> <li>• Trafic des vésicules GluT4 (<i>cellules musculaires</i>)</li> </ul>
<b>Rab14</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome précoce</li> <li>• Appareil de Golgi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport vésiculaire entre l'endosome précoce et l'appareil de Golgi</li> <li>• Trafic des vésicules GluT4</li> </ul>
<b>Rab15</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome précoce</li> <li>• Endosome de recyclage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recyclage des molécules internalisées lors de l'endocytose</li> </ul>
<b>Rab17</b> ( <i>cellules épithéliales</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome précoce</li> <li>• Endosome de recyclage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recyclage des molécules internalisées lors de l'endocytose</li> </ul>
<b>Rab21</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome précoce</li> <li>• Endosome de recyclage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recyclage des molécules internalisées lors de l'endocytose</li> </ul>
<b>Rab22a</b> <b>Rab22b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome précoce</li> <li>• Appareil de Golgi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport vésiculaire entre l'endosome précoce et l'appareil de Golgi</li> </ul>
<b>Rab27a</b> <b>Rab27b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome multivésiculaire</li> <li>• Vésicules intraluminales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fusion des endosomes multivésiculaires à la membrane plasmique</li> <li>• Libération des exosomes</li> </ul>
<b>Rab31</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endosome précoce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trafic des vésicules GluT4</li> </ul>
<b>Rab35</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vésicules d'endocytose reouvertes de clathrine</li> <li>• Endosome précoce</li> <li>• Membrane plasmique</li> <li>• Endosome multivésiculaire</li> <li>• Vésicules intraluminales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recyclage des molécules internalisées lors de l'endocytose</li> <li>• Fusion des endosomes multivésiculaires à la membrane plasmique</li> <li>• Libération des exosomes</li> <li>• Trafic des vésicules GluT4 (<i>adipocytes</i>)</li> </ul>

Etablit à partir de (Jahn, Lang et al. 2003; Kaddai, Le Marchand-Brustel et al. 2008; Nokes, Fields et al. 2008; Hsu, Morohashi et al. 2010; Ostrowski, Carmo et al. 2010; Sun, Bilan et al. 2010; Escrevente, Keller et al. 2011; Davey, Humphrey et al. 2012; Galvez, Gilleron et al. 2012; Hosseini-Beheshti, Pham et al. 2012)



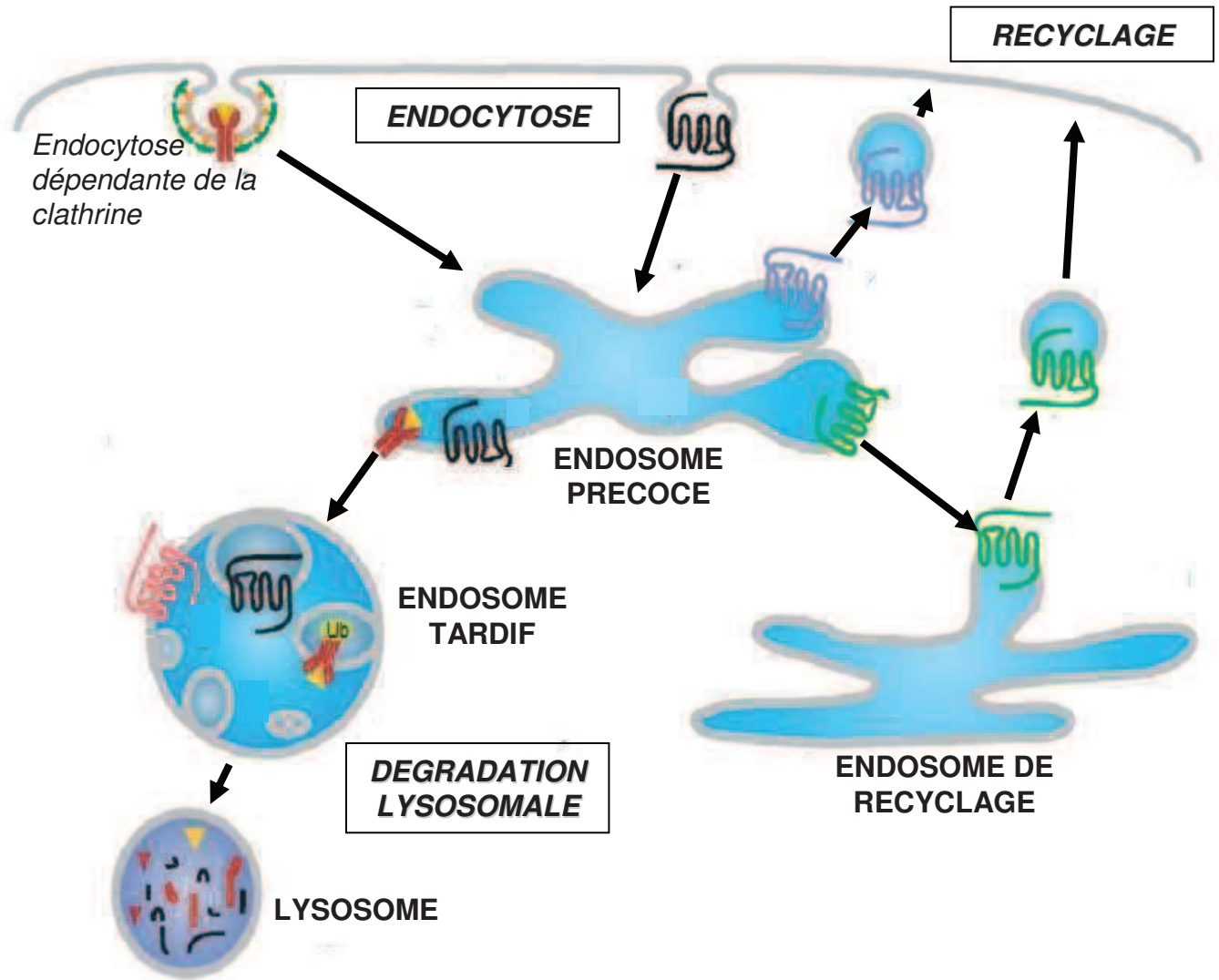
**Figure 9** Micrographie des endosomes précoces observés en ME (cellules HeLa). Les endosomes précoces contiennent la protéine transferrine couplée à l'enzyme HRP (horse radish peroxydase)  
*d'après Huotari and Helenius 2011*

Les différents compartiments de la voie endosomale ne sont pas des structures figées, et ils vont subir des remaniements de leurs membranes et de leur contenu luminal (Bishop 2003). De plus, les interactions de ces compartiments endosomaux avec le cytosquelette permettent de réguler leur localisation au sein de la cellule et de moduler leur morphologie. De ce fait, une régulation fine et coordonnée de ce trafic vésiculaire est essentielle et permet la bonne biogenèse de ces différents endosomes que nous allons décrire dans ce chapitre (Bishop 2003).

## **II.2.1 Les endosomes précoces**

Les endosomes précoces sont localisés en périphérie cellulaire, vers la membrane plasmique. Dépendant des microtubules, leurs distributions et leurs nombres varient selon le type cellulaire (Hoepfner, Severin et al. 2005; Huotari and Helenius 2011). En ME, ces organelles apparaissent selon une structure particulière tubulo-vacuolaire, caractéristique de leur rôle de tri des molécules internalisées dans les vésicules d'endocytose (Figures 4 et 9) (Geuze, Slot et al. 1987; Gruenberg, Griffiths et al. 1989; Gruenberg and Maxfield 1995; Miaczynska, Christoforidis et al. 2004; Lakadamyali, Rust et al. 2006; van Meel and Klumperman 2008; Huotari and Helenius 2011). Considéré comme le principal point de routage de la voie endosomale, la région centrale de l'endosome précoce est le lieu où les molécules sont essentiellement dirigées vers l'endosome tardif, tandis que le réseau de tubules de 60 nanomètres de diamètre qui prolongent l'organite est le centre du recyclage des protéines et lipides (Maxfield and McGraw 2004; Huotari and Helenius 2011).

A ce jour, la biogenèse de ce compartiment de tri n'est pas bien définie. Cependant, l'étude de sa composition membranaire et de son contenu, laissent penser que celui-ci est formé principalement à partir de vésicules d'endocytose qui fusionneraient entre elles (Huotari and Helenius 2011). Ce compartiment est en permanence présent dans la cellule parce qu'il reçoit aussi bien les vésicules issues de l'endocytose dépendante de la clathrine que celles issues des autres voies d'endocytose (Mayor and Pagano 2007; Huotari and Helenius 2011). Le pH



**Figure 10** Devenir du contenu de la vésicule d'endocytose après le tri dans l'endosome précoce  
*d'après Gaborik and Hunyady 2004*

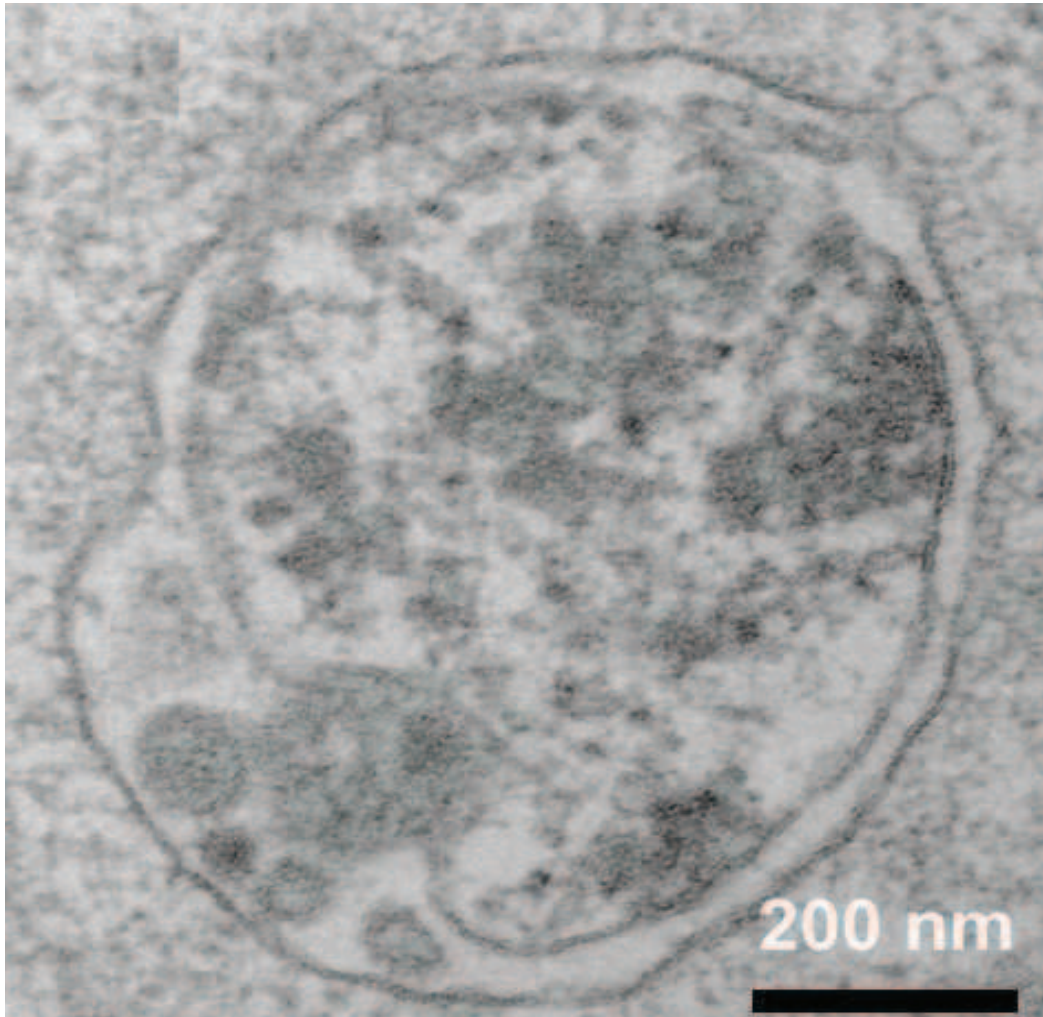
légèrement acide (pH~6) de l'endosome précoce va permettre la dissociation des ligands fixés à leur récepteurs, internalisés dans les vésicules d'endocytose (Johnson, Dunn et al. 1993). Le contenu vésiculaire suit alors deux voies: le recyclage ou la dégradation (Figures 10).

Le recyclage peut se faire selon deux mécanismes : les molécules sont redirigées à la membrane plasmique ou elles transitent par un compartiment intermédiaire, l'endosome de recyclage (Figures 4 et 10). Ce dernier est uniquement constitué d'un réseau de longs tubules membranaires, détachés de la région tubulaire périphérique de l'endosome précoce dont ils sont originaires (Maxfield and McGraw 2004). Les vésicules de recyclage issues de ces endosomes sont acheminées à la membrane plasmique grâce à l'action conjointe des protéines Rab et des moteurs moléculaires (kinésines et myosine de type I et V, notamment) aux fibres du cytosquelette (filaments d'actine et microtubules) (Soldati and Schliwa 2006). Le processus du tri des molécules internalisées dans les endosomes précoces dure 10 minutes, puis leur recyclage à la membrane plasmique ou leur dégradation dans les endosomes tardifs (puis multivésiculaires) s'effectue (Maxfield and McGraw 2004; Huotari and Helenius 2011).

L'endosome précoce communique également avec le réseau Golgien via des échanges bidirectionnels de vésicules, sous le contrôle notamment des protéines du complexe rétromère (complexe multiprotéique qui régule le trafic intracellulaire) et de la protéine Rab9 et de son effecteur protéique TIP47 (tail interacting protein of 47 kDa), permettant entre autres l'apport d'hydrolases dans les endosomes précoces afin que le processus de dégradation puisse s'effectuer dans les endosomes tardifs (Bonifacino and Rojas 2006; Huotari and Helenius 2011).

La membrane de l'endosome précoce comporte plusieurs domaines protéolipidiques différents, en terme de composition et de fonction, selon leurs localisations dans la région centrale ou périphérique de l'organelle (Zerial and McBride 2001; Huotari and Helenius 2011). Riches en protéines Rab4, Rab5 et Rab11, la plupart de ces domaines sont localisés dans les extensions tubulaires de l'endosome où se déroule le recyclage des molécules. Rab5 est une protéine clef dans la fonctionnalité





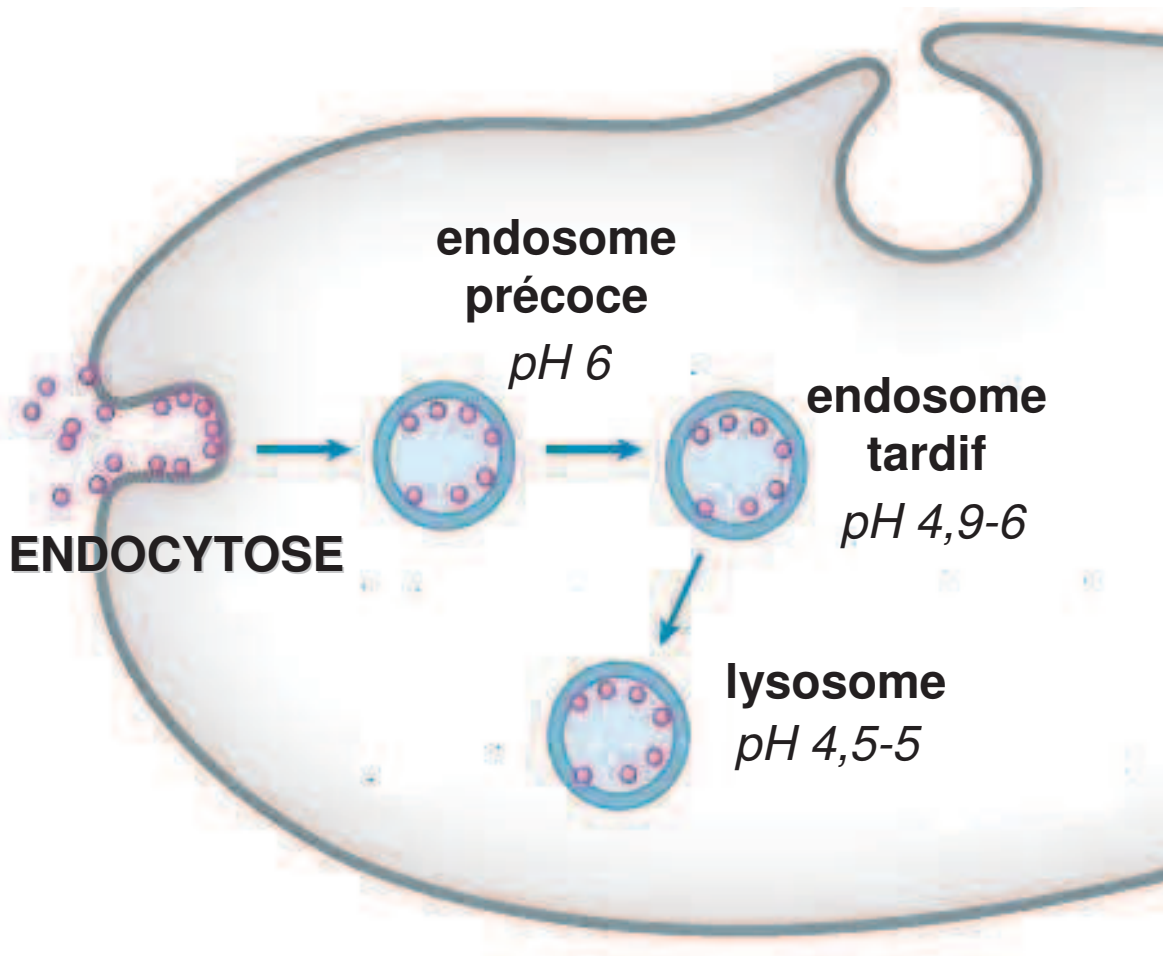
**Figure 11** Endosome tardif de cellules HeLa observé en ME  
*d'après Huotari and Helenius 2011*

de l'endosome précoce. Cette protéine est présente au niveau de la membrane de la vésicule d'endocytose. Elle est également présente à la membrane de l'endosome précoce, et est utilisée comme marqueur protéique pour identifier ce compartiment endosomal (Tableau 1).

Les phosphoinositides sont impliqués dans le trafic membranaire des vésicules échangées durant la voie endosomale (Simonsen, Wurmser et al. 2001; Gruenberg 2003). Le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) est enrichi dans les membranes des endosomes précoces, des corps multivésiculaires et des vésicules impliquées dans la voie endosomale, comparé à la membrane des endosomes tardifs (Gillooly, Morrow et al. 2000; Gruenberg 2003). L'association de Rab5 avec le complexe VPS34/p150 (une phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) entraîne la phosphorylation du phosphatidylinositol en PI3P et va permettre de réguler les modifications structurelles de la membrane des endosomes précoces. L'action coordonnée de Rab4 et de Rab5 permet d'initier le processus de recyclage

## **II.2.2 Les endosomes tardifs et multivésiculaires (MVE)**

Les endosomes tardifs se forment moins de 30 minutes après le processus d'endocytose. Ils ont une structure sphérique d'un diamètre variable entre 400 et 500 nanomètres (Figure 11) (Piper and Luzio 2001; Gruenberg and Stenmark 2004). Les premières études sur l'endosome tardif laissaient penser que cet organite était indépendant des endosomes précoces, et que le contenu destiné à être dégradé était transporté par des vésicules endosomales (Piper and Luzio 2001). Il semblerait en fait que ces deux compartiments endosomaux ne soient pas indépendants, et que les endosomes tardifs résulteraient de la région centrale vacuolaire des endosomes précoces. La fission de la région vacuolaire de l'endosome précoce du reste de la structure serait contrôlée par la dynamine (Huotari and Helenius 2011; Mesaki, Tanabe et al. 2011). L'endosome tardif va alors subir un processus de maturation finement coordonné qui est régulé par des protéines cytosoliques, aboutissant à des



**Figure 12** pH intraluminal de l'endosome précoce et tardif  
*d'après Mindell 2012*

modifications de sa composition membranaire et luminale (Huotari and Helenius 2011).

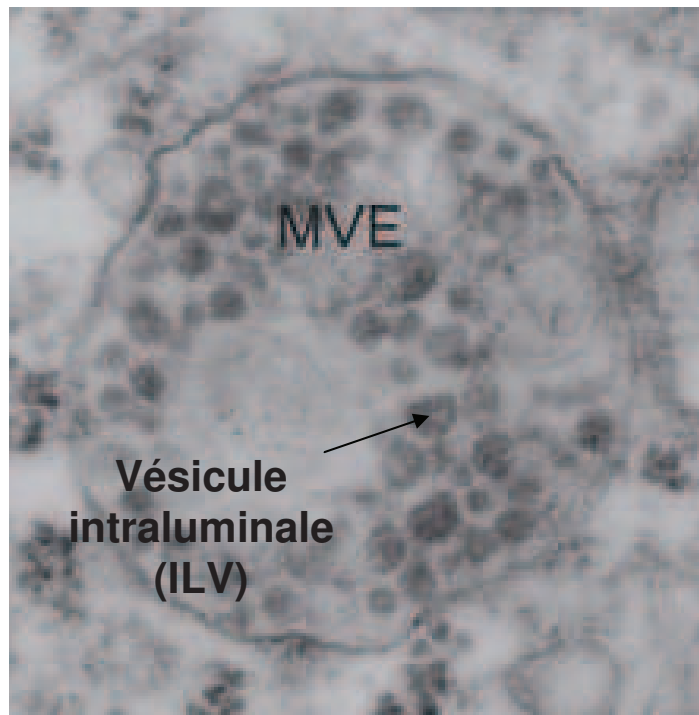
Les endosomes sont des structures hautement dynamiques et sont délocalisés au sein de la cellule, grâce à des moteurs moléculaires associés aux microtubules du cytosquelette. Différents moteurs moléculaires existent et permettent le déplacement des endosomes dans une direction donnée. Les endosomes peuvent se déplacer dans les deux sens le long du microtubule (observé en microscopie), selon l'implication de deux moteurs moléculaires distincts : la dynéine (en direction de l'extrémité (-) du microtubule) et la kinésine (en direction de l'extrémité (+) du microtubule) (Pfeffer 1999). Au cours de sa maturation, l'endosome migre depuis la périphérie de la cellule en direction du noyau (Figure 4).

Un changement structurel majeur survient lors de cette étape de maturation : la conversion des protéines Rab (« Rab switch »). La protéine Rab spécifique des endosomes précoces Rab5 est remplacée par Rab7, marqueur spécifique des endosomes tardifs (Figure 8 et Tableau 1) (Rink, Ghigo et al. 2005; Vonderheit and Helenius 2005; Huotari and Helenius 2011; Platta and Stenmark 2011).

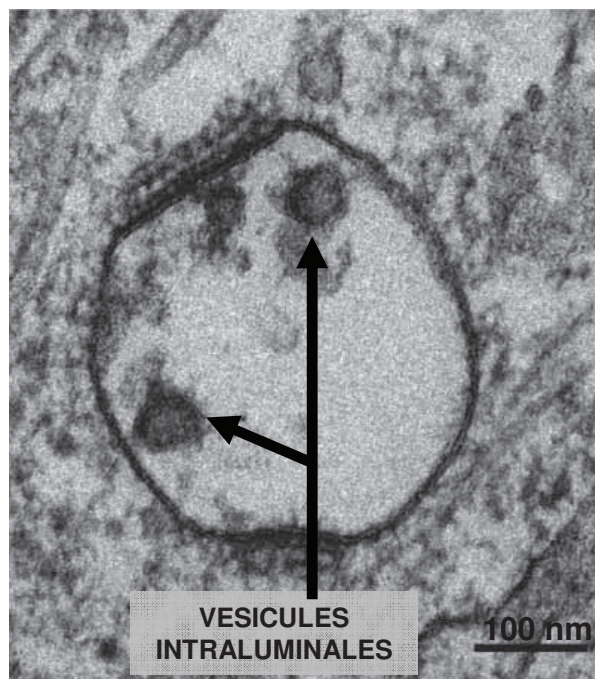
La structure membranaire est également modifiée du point de vue lipidique avec la phosphorylation du PI3P, ce permet la formation de phosphatidylinositol-3,5-biphosphate (PI3,5P2). Cette conversion est une étape importante pour permettre la fusion de l'endosome aux lysosomes (dégradation du contenu internalisé). Elle est également nécessaire à la formation des vésicules intraluminales à partir de la membrane de l'endosome, via les protéines cytosoliques du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Huotari and Helenius 2011). La membrane de l'endosome tardif est également constituée de cholestérol, de radeaux lipidiques riches en sphingolipides et en glycoprotéines membranaires lysosomales (LAMP1 (lysosome associated membrane protein) notamment) (Mukherjee and Maxfield 2004; Huotari and Helenius 2011).

La maturation de l'endosome tardif s'accompagne d'une acidification de la lumière de l'organite (pH compris entre 4,9 et 6) (Figure 12) (Falguieres, Luyet et al. 2008; Huotari and Helenius 2011)

Les endosomes tardifs matures fusionnent soit entre eux (fusion homotypique) soit avec les lysosomes, via les protéines Rab7 et Rab14 (fusion hétérotypique). La



**Figure 13** Endosome multivésiculaire de cellule épithéliale de *D. melanogaster* observé en ME  
*d'après Wegner et al. 2011*



**Figure 14** Vésicules intraluminales dans un endosome précoce (micrographie d'observation ME)  
*d'après Huotari and Helenius 2011*

fusion des endosomes tardifs au lysosome conduit à la formation d'un compartiment hybride, l'endolysosome, où survient la dégradation des protéines et des lipides par les enzymes lysosomales et les hydrolases acides (Pryor, Mullock et al. 2000; Piper and Luzio 2001; Huotari and Helenius 2011).

De nombreuses vésicules intraluminales (intraluminal vesicles, ou ILV) dont les tailles sont comprises entre 30 et 100 nanomètres peuvent également se former au sein de l'endosome tardif, qui prend alors le nom d'endosome multivésiculaire (MVE, ou corps multivésiculaire) (Huotari and Helenius 2011). Observés pour la première fois dans les années 50 par Porter et Palade (Palade 1955; Sotelo and Porter 1959; Henne, Buchkovich et al. 2011), les mécanismes de genèse de ce compartiment endosomal d'un diamètre variant entre 200 nanomètres et 1 micromètre commence depuis peu à être expliqué (Von Bartheld and Altick 2011). D'origine endosomale, on retrouve des marqueurs membranaires caractéristiques des endosomes (comme les protéines de la famille Rab et LAMP) à la membrane des MVE.

La membrane délimitant le compartiment endosomal tardif en cours de maturation va subir un processus d'invagination au sein de la lumière de l'organite, conduisant ainsi à la formation de vésicules intraluminales (Figure 13). L'invagination membranaire est accompagnée de l'internalisation, dans la vésicule en formation, de diverses molécules présentes à la membrane de l'endosome, mais également issues du cytosol cellulaire (Huotari and Helenius 2011). Cependant la formation de ces vésicules n'est pas restreinte aux endosomes tardifs en cours de maturation, des endosomes situés en périphérie cellulaire comme les endosomes précoces, peuvent contenir aussi des ILV (Piper and Luzio 2001; Huotari and Helenius 2011) (Figure 14).

### **II.2.3 Les vésicules intraluminales (ILV)**

La formation des ILV à partir de la membrane de l'endosome est un processus hautement et finement régulé et relativement rapide. En effet, la formation des

vésicules a été estimée à 7,5 minutes, soit 30 minutes après l'endocytose survenue au niveau de la membrane plasmique (Falguières, Luyet et al. 2009; Von Bartheld and Altick 2011).

### **II.2.3.a Biogenèse des ILV**

L'invagination de la membrane de l'endosome multivésiculaire est contrôlée d'une part par sa composition lipidique spécifique, et d'autre part par les protéines membranaires associées qui permettent d'initier la déformation de la membrane (Stuffers, Brech et al. 2009).

#### **II.2.3.a.1 Composition lipidique de la membrane des ILV**

Quatre lipides majeurs de la membrane des MVE sont retrouvés à la membrane des ILV : le PI3P, les céramides (sphingolipide), le cholestérol et l'acide lyso-*bis*-phosphatidique (LBPA) (Trajkovic, Hsu et al. 2008; Babst 2011; Henne, Buchkovich et al. 2011). Concentrés en domaines au niveau des radeaux lipidiques de la membrane de l'endosome multivésiculaire, ils sont impliqués dans l'invagination de la membrane des MVE, la régulation de la formation des ILV et dans leur devenir (Piper and Katzmann 2007). Ces différents lipides sont également retrouvés à la membrane des ILV, attestant leur origine dépendante des rafts (Mobius, van Donselaar et al. 2003; Babst 2011).

##### **• *PI3P et son dérivé phosphorylé PI3,5P2***

Le PI3P est enrichi au niveau du versant cytosolique de la membrane de l'endosome précoce. Observé majoritairement dans les endosomes précoces, il tend à disparaître au cours de la maturation de l'endosome tardif où il est phosphorylé pour donner le PI3,5P2, par une protéine kinase spécifique (Fab1/PIKfyve kinase) (Piper and Katzmann 2007). Il est également présent du côté cytosolique de la membrane limitante du MVE et est retrouvé à la membrane des ILV. Ce lipide

semblerait permettre la bonne internalisation des protéines ubiquitinylées dans les ILV (Michelet, Djeddi et al. 2010).

- *Cholestérol*

Le cholestérol enrichi à la membrane des MVE, est également retrouvé à la membrane des ILV (Wubbolts, Leckie et al. 2003). Ce lipide semblerait favoriser l'invagination de la membrane de l'endosome, mais aussi faciliter les processus de bourgeonnement et de réorganisation de domaines protéiques présents à la membrane des MVE, comme les complexes tétraspanines-intégrines (Silvie, Charrin et al. 2006; Piper and Katzmann 2007; Wang, Yang et al. 2007, Charrin, 2003 #1856) (Charrin, Manie et al. 2003).

- *Céramides*

Les céramides sont issus de la conversion de la sphingomyéline (sphingolipides) par les sphingomyelinases. Ils ont un rôle fonctionnel important en stabilisant les radeaux lipidiques et en promouvant l'invagination de la membrane des MVE (van Dommelen, Vader et al. 2012; Yuyama, Sun et al. 2012). Impliqués dans la formation des ILV, ils sont également important pour la fusion des MVE à la membrane plasmique, permettant ainsi la libération des ILV dans le milieu extracellulaire (Trajkovic, Hsu et al. 2008; Woodman and Futter 2008; Pant, Hilton et al. 2012; Yuyama, Sun et al. 2012).

- *LBPA ou BMP (bis monoacyl-glycérol phosphate)*

De par sa morphologie en forme de cône et ses propriétés hydrophobiques, l'acide lyso-*bis*-phosphatidique joue également un rôle dans l'invagination de la membrane du MVE (Piper and Luzio 2001; Piper and Katzmann 2007; Babst 2011). Enrichi dans les endosomes tardifs mais pas détecté dans les compartiments endosomaux précoces, son action est coordonnée à celle de son effecteur protéique 'Alix' (apoptosis-linked gene-2 (ALG2) interacting protein X, protéine accessoire du complexe ESCRT, défini ci-dessous) pour réguler la déformation membranaire de l'endosome en milieu acide (pH luminal de l'endosome tardif) (Matsuo, Chevallier et



**Tableau 2 Les protéines de la famille ESCRT, leurs interactions et leurs fonctions au cours de l'invagination de la membrane de l'endosome multivésiculaire**

Complexes	Sous unités		Interactions	FONCTIONS
	<i>Levure Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homologue mammalien</i>		
<b><u>ESCRT-0</u></b>	Vps27	HRS (HGS)	PI3P, ubiquitine, clathrine, Vps23 (ESCRT-I)	Regroupement des molécules à internaliser
	Hse1	STAM1,2		
<b><u>ESCRT-I</u></b>	Vps23	TSG101	Ubiquitine, Vps27 (ESCRT-0), Vps36 (ESCRT-II)	Bourgeonnement membranaire
	Vps28	hVPS28		
	Vps37	VPS37A,B,C		
	Mvb12	hMVB12A,B		
<b><u>ESCRT-II</u></b>	Vps36	EAP45	PI3P, ubiquitine, Vps28 (ESCRT-I), Vps20 (ESCRT-III)	Bourgeonnement membranaire
	Vps22	EAP30 (SNF8)		
	Vps25	EAP20		
<b><u>ESCRT-III</u></b>	Vps20	CHMP6	Ubiquitine, Vps28 (ESCRT-I), Vps25 (ESCRT-II), complexe Vps4, Alix, PI3,5P2	Constriction et scission de la membrane
	Vps32 (Snf7)	CHMP4A,B,C		
	Vps24	CHMP3		
	Vps2 (Did4)	CHMP2A,B		
<b><u>Vps4</u></b>	Vps4	VPS4A,B (SKD1)	Toutes les sous-unités du complexe ESCRT-III	Scission de la membrane Désassemblage d'ESCRT-III
	Vps60 (Mos10)	CHMP5		
	Vta1	LIP5		

Etablit à partir de Williams and Urbe 2007; Hanson, Shim et al. 2009; Lata, Schoehn et al. 2009; Hurley and Hanson 2010; Michelet, Djeddi et al. 2010; Henne, Buchkovich et al. 2011

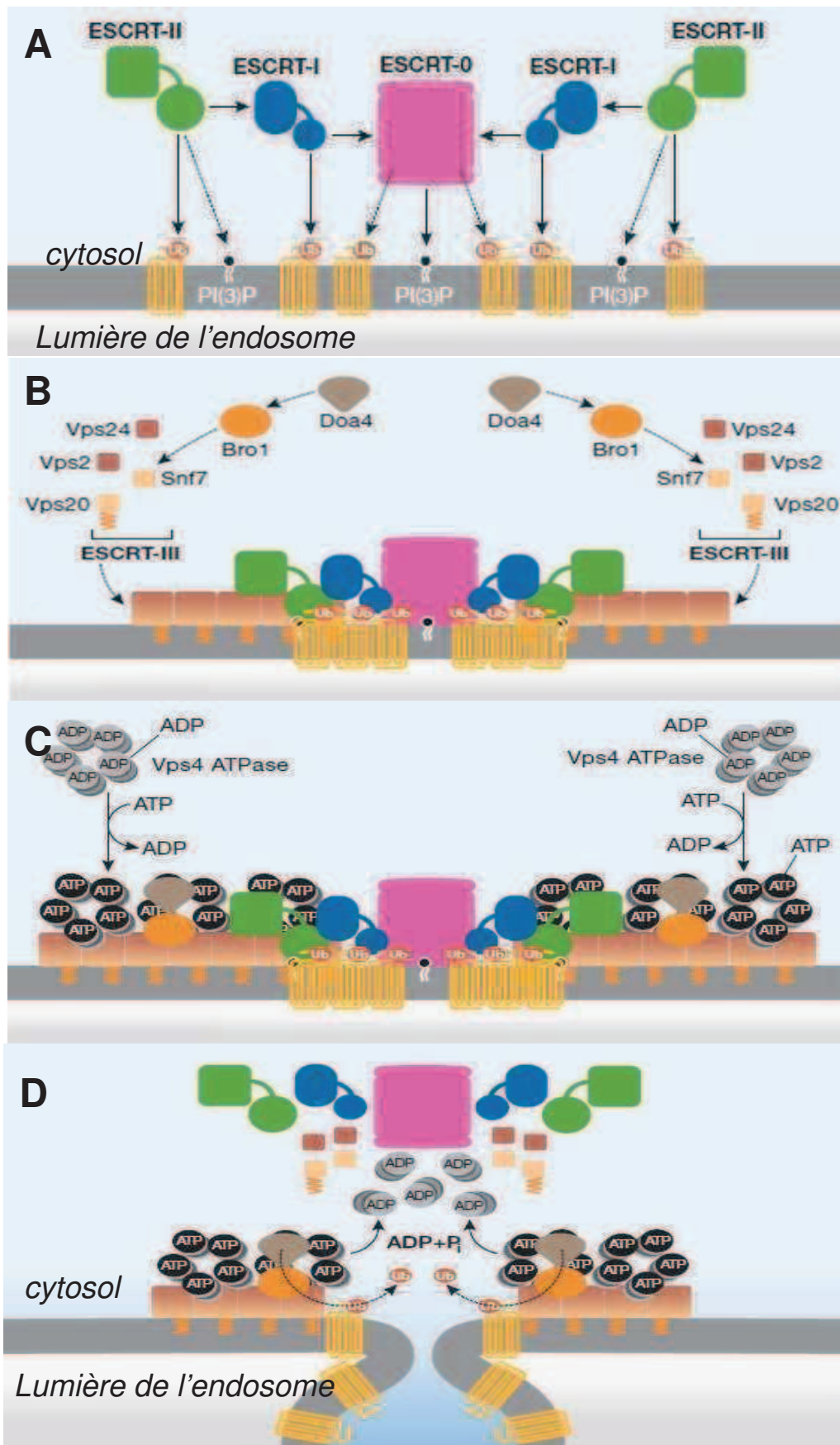
al. 2004; Falguières, Luyet et al. 2009). Le LBPA régule aussi les processus de fission et de fusion des ILV (Trajkovic, Hsu et al. 2008; Falguières, Luyet et al. 2009).

### **II.2.3.a.2 Protéines impliquées dans la formation des ILV**

La formation des ILV requiert aussi les protéines de la famille ESCRT. Elles sont impliquées dans l'invagination de la membrane des MVE, ainsi que dans l'internalisation de protéines spécifiques dans les ILV en formation (Babst 2011). Une seconde famille protéique, les tétraspanines, est aussi décrite pour son implication dans l'invagination membranaire et dans la sélection des molécules à internaliser dans les ILV (Pant, Hilton et al. 2012; Rana, Yue et al. 2012).

#### *• Protéines de la famille ESCRT*

Le mécanisme le mieux connu pour l'invagination de la membrane de l'endosome tardif pour former les ILV, est celui qui met en jeu les protéines de la famille ESCRT (Figure 15 et Tableau 2) (de Gassart, Geminard et al. 2004; Dikic 2004; Falguières, Luyet et al. 2009; Pant, Hilton et al. 2012). Identifiées en premier lieu chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les protéines vps (vacuolar protein sorting) de la classe E, ont été définies comme ayant un rôle d'internalisation des protéines marquées par un signal 'ubiquitine' (Piper and Luzio 2001; Buschow, Liefhebber et al. 2005; Henne, Buchkovich et al. 2011). Leurs orthologues chez les mammifères, les différentes protéines de la famille ESCRT, ont été caractérisés dans les années 2000 comme étant des médiateurs clés de la formation des MVE (Katzmann, Babst et al. 2001; Babst, Katzmann et al. 2002; Babst, Katzmann et al. 2002; Henne, Buchkovich et al. 2011). Au nombre de quatre (ESCRT-0 à III), bien que la protéine Vps4 soit considérée comme le 5<sup>ème</sup> membre du complexe, ces protéines sont très bien conservées parmi les espèces (Babst 2005; Hanson, Shim et al. 2009). Ces protéines jouent également d'autres rôles biologiques importants (au cours de la division cellulaire notamment) et leur altération est responsable de nombreuses pathologies (tumeurs, maladies neurodégénératives...) (Stuffers, Brech et al. 2009; Henne, Buchkovich et al. 2011).



**Figure 15** Les différentes protéines de la famille ESCRT impliquées dans la biogenèse des ILV. **A** : recrutement des protéines ESCRT-0, ESCRT-I et ESCRT-II ; **B** : assemblage de la protéine ESCRT-III ; **C** : recrutement du complexe Vps4 ; **D** : formation de l'ILV et internalisation des protéines déubiquitinylées  
d'après Nickerson et al. 2007

Le modèle décrit pour la formation des ILV couplée à l'internalisation des molécules est le suivant (Figure 15) :

► ESCRT-0 est la première protéine à être recrutée au niveau des radeaux lipidiques de la membrane de l'endosome tardif. Cette protéine est constituée de deux sous-unités : Hrs (Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate) (ou Vps27) et STAM 1/2 (Signal Transducing Adaptor Molecule 1/2) (ou Hse1). Les deux sous-unités de la protéine interagissent avec le PI3P de la membrane endosomale et avec les protéines ubiquitinylées. La molécule d'ubiquitine qui est un signal pour l'internalisation des protéines dans les ILV, reconnaît le motif UBD (Ubiquitin-Binding Domain) des sous-unités de la protéine ESCRT-0 (Hicke 1999; Strous and Govers 1999; Bishop 2003; Raiborg and Stenmark 2009, Bishop, 2002 #1891; Piper and Lehner 2011). Cependant, il semblerait que l'internalisation de protéines non ubiquitinylées soit possible, bien que ce mécanisme et le tri des protéines internalisées ne soient pas encore à ce jour bien expliqués (Shields and Piper 2011). La clathrine semblerait également jouer un rôle dans l'organisation et dans la stabilisation du processus d'internalisation (Henne, Buchkovich et al. 2011). Cependant sa présence n'est pas indispensable, des ILV peuvent être formées en son absence (Piper and Katzmann 2007). Ces différentes interactions permettent d'initier la première étape de la formation des MVE (Babst 2011). La composition lipidique de la membrane de l'endosome multivésiculaire permet l'initiation de la déformation de la membrane et en parallèle, permet le recrutement de la protéine ESCRT-I.

► ESCRT-I : C'est un oligomère protéique comportant les sous-unités Vps23 (ou Tsg101, tumor susceptibility gene 101), Vps28, Vps37 et Mvb12 (multivesicular body 12). Cet hétérotétramère de 350 kDa et d'une vingtaine de nanomètres de long, interagit à la fois avec ESCRT-0 et avec les protéines ubiquitinylées, via la sous-unité Vps23 qui comportent des domaines d'interaction avec l'ubiquitine (Bishop, Horman et al. 2002; Razi and Futter 2006; Raiborg and Stenmark 2009; Piper and Lehner 2011). Vps23 est une protéine clef dans la formation des ILV. En son absence, la formation des ILV est altérée et les MVE observés possèdent peu d'ILV (Bishop, Horman et al. 2002; Razi and Futter 2006; Henne, Buchkovich et al. 2011).

► ESCRT-II est ensuite recrutée au niveau du complexe protéique à la membrane des MVE. ESCRT-II est un hétérotétramère de 155 kDa formé à partir de trois sous-unités distinctes EAP (ELL-associated proteins) : EAP30 (ou Vps22), EAP45 (ou Vps36) et deux unités EAP20 (ou Vps25). ESCRT-II interagit avec ESCRT-I et peut également lier le PI3P (Falguières, Luyet et al. 2009). Le complexe ESCRT-II possède lui aussi des domaines d'interaction avec l'ubiquitine. Toutefois la liaison entre les complexes ESCRT avec les protéines ubiquitinylées est principalement régie par ESCRT-0 qui possède le plus de domaines d'interaction à l'ubiquitine (Raiborg and Stenmark 2009; Henne, Buchkovich et al. 2011; Piper and Lehner 2011). Si ESCRT-I et ESCRT-II semblent avoir des fonctions voisines, ESCRT-I n'est pas indispensable chez la levure, et ESCRT-II n'est pas indispensable dans les cellules de mammifères, dans la formation des ILV (Babst 2011). Le recrutement d'ESCRT-II est une pré-étape pour l'assemblage et la fonction d'ESCRT-III.

► ESCRT-III est un hétérotétramère constitué des sous unités CHMP6 (ou Vps20), CHMP4 (ou Vps32), CHMP3 (ou Vps24) et CHMP2 (ou Vps2) (CHMPs, charged-multivesicular body proteins) (Figure 15). Il ne s'agit pas d'un complexe protéique stable dans le cytoplasme, c'est pourquoi dans un premier temps, ces quatre monomères doivent s'associer pour former la protéine ESCRT-III fonctionnelle de 450 kDa (Henne, Buchkovich et al. 2011). L'assemblage débute par l'interaction de la sous-unité CHMP6 avec la sous-unité EAP45 de ESCRT-II, puis l'assemblage total de la protéine ESCRT-III est réalisé. Pour que ce complexe protéique soit fonctionnel, des protéines accessoires sont recrutées comme Bro1 (BCK1-like resistance to osmotic shock protein-1), Alix (apoptosis-linked gene-2 (ALG2) interacting protein X) et AIP1 (actin-interacting protein 1) (Lata, Schoehn et al. 2009), et permettent de stabiliser et de connecter le complexe ESCRT-III avec les complexes ESCRT-I et ESCRT-II au niveau de la membrane endosomale en cours d'invagination. Alix et AIP1 reconnaissent les motifs ubiquitines présents sur les protéines à internaliser (Dikic 2004; Falguières, Luyet et al. 2009). ESCRT-III interagit également avec le PI3,5P2.

**Tableau 3 Protéines de la famille des Tétraspánines et leurs interactions protéiques connues à ce jour (*Liste non exhaustive*)**

TETRASPANINES	Nombre Cystéines EC2	Interactions protéiques
Tspan1/NET-1/TM4-C Tspan2/NET-3	4	
Tspan3/TM4-A/TM4SF8 Tspan4/NAG-2/TM4SF7	8	<u>Intégrines</u> α3β1, α6β1
Tspan5/NET-4/TM4SF9 Tspan6/TM4-D/TM4SF8	8	<u>Intégrines</u> β1 <u>Intégrines</u> α3β1, α6β1
Tspan7/TM4SF2/CD231 Tspan8/TM4SF3/C0-029	8	
Tspan9/NET-5 Tspan10/oculospanine	8	
Tspan11 Tspan12/NET-2/TM4SF12	8	
Tspan13/NET-6/TM4SF13 Tspan14/DC-TM4F2/TM4SF14	8	
Tspan15/NET-7/TM4SF15 Tspan16/TM4-B/TM4SF16	8	
Tspan17/TM4SF17 Tspan18	8	
Tspan19 Tspan20/UP1b	7	UP1a, UPII, UPIII UP1b, UPII, UPIII
Tspan21/UP1a Tspan22/Peripherin2/RDS	7	Peripherine/RDS
Tspan23/ROSP1 Tspan24/CD151	7	<u>Intégrines</u> α11bβ3, α2β1, α3β1, α4β1, α5β1, α6β1, α7β1, α6β4 CD46
Tspan25/CD53	4	<u>Intégrines</u> α4β1 CMH -I, CMH -II, CD2. HLA-DR. γ-glutamyl transpeptidase
Tspan26/CD37 Tspan27/CD82	4	CMH -II. HLA-DR. γ-glutamyl transpeptidase <u>Intégrines</u> αLβ2, α3β1, α4β1, α5β1, α6β1. CD4, CD8, CD81, CD19, CD46. CMH -I, CMH -II. HLA-DR. proHB-EGF. γ-glutamyl transpeptidase. récepteur EGF
Tspan28/CD81	4	<u>Intégrines</u> α3β1, α4β1, α5β1, α6β1, α7β1, α4β7, αVβ7, CD3, CD4, CD82, CD8, CD19, CD21, CD46, CMH-I, CMH -II. CD9, CD63. HLA-DR. proHB-EGF. γ-glutamyl transpeptidase
Tspan29/CD9	4	<u>Intégrines</u> α1β1, α2β1, α3β1, α4β1, α5β1, α6β1, α7β1, α11bβ3, α6β4 CD19, CD3, CD4, CD42, CD44, CD46, CD47, CD63, CD81. HLA-DR. proHB-EGF
Tspan30/CD63	4	<u>Intégrines</u> α11bβ3, αLβ2, αMβ2, α3β1, α4β1, α6β1. CD9, CD81. proHB-EGF
Tspan31/SAS Tspan32/PHEMX	4	α11bβ3
Tspan33	8	

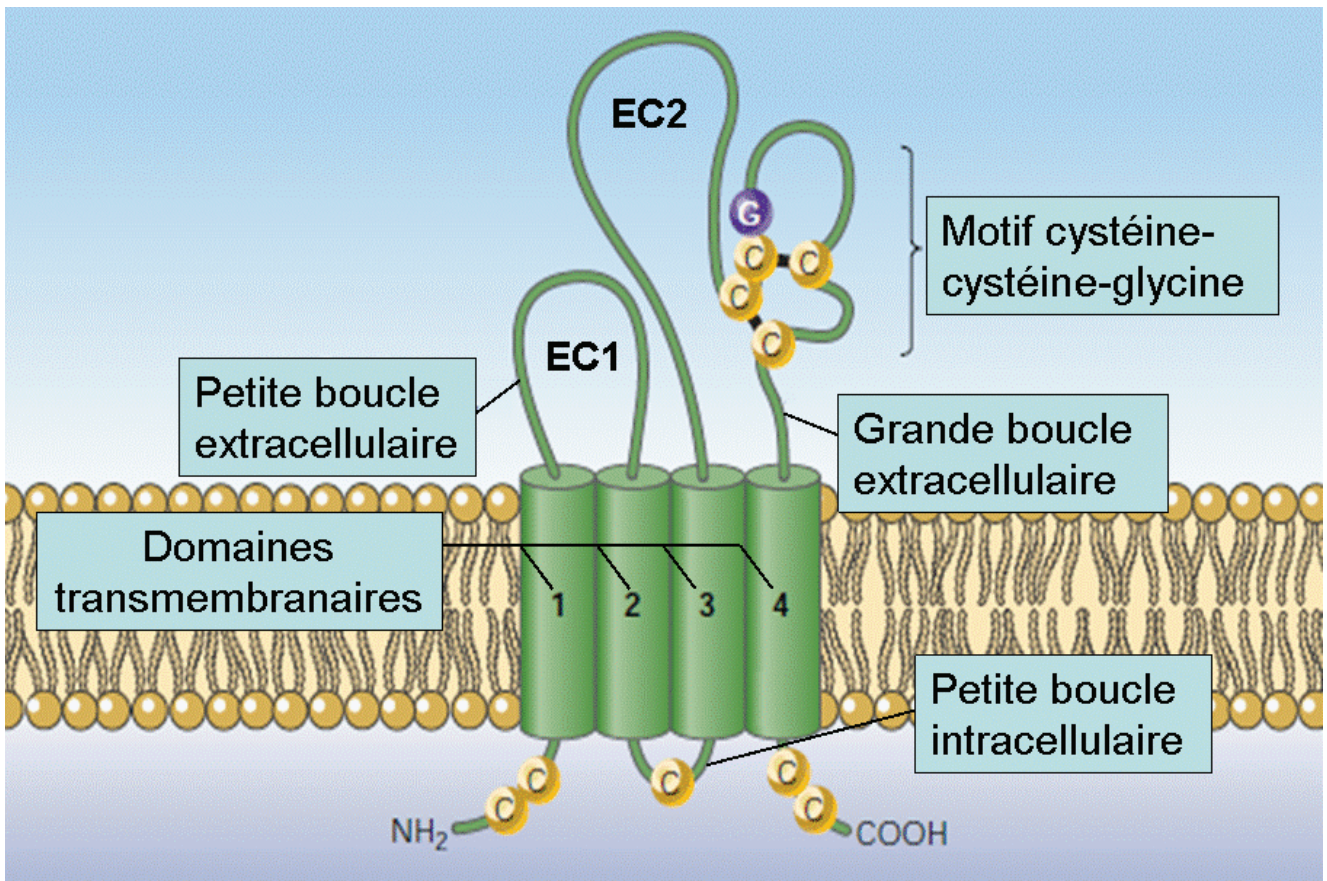
Etabli à partir de Maecker, Todd et al. 1997; Berditchevski 2001; Boucheix and Rubinstein 2001; Charrin, le Naour et al. 2009; Bassani and Cingolani 2012

La dernière étape de la formation des ILV requiert le complexe Vps4 (une ATPase de classe I AAA, ATPase associated with various cellular activities). Combiné à l'action d'ESCRT-III, ce complexe va enlever les résidus 'ubiquitine' des protéines internalisées d'une part (Henne, Buchkovich et al. 2011) et détacher la vésicule de la membrane des MVE (scission) d'autre part (Babst 2011). L'ubiquitine est clivée juste avant l'incorporation des protéines dans la vésicule naissante. Ceci est effectué par des enzymes appartenant à la superfamille des isopeptidases, les dé-ubiquitinases (ou enzymes dé-ubiquitinisantes, Doa4/Ubp4 chez la levure) qui sont capables d'enlever le/les résidu(s) d'ubiquitine (environ 79 sont codés par le génome humain) (Figure 15) (Komander, Clague et al. 2009; Raiborg and Stenmark 2009). Alors que le signal « ubiquitine » sert pour l'entrée des molécules d'intérêt lors de l'invagination de la membrane endosomale, le processus de « déubiquitylation » serait également une étape clef, afin de préserver les protéines internalisées de la dégradation par les lysosomes, bien que le mécanisme ne soit pas encore compris à ce jour (Falguieres, Luyet et al. 2009; Babst 2011; Piper and Lehner 2011; Rusten, Vaccari et al. 2012). En parallèle, le complexe Vps4-ESCRT-III va permettre la dissociation d'ESCRT-III, ainsi que la libération des autres complexes ESCRT de la membrane endosomale. La scission de l'ILV est contemporaine du recyclage des différentes composantes protéiques mises en jeu ; ce processus n'est pas encore clairement défini à ce jour (Bishop 2003; Henne, Buchkovich et al. 2011).

Toutefois, il a été montré que l'absence fonctionnelle des protéines ESCRT n'empêchait pas la formation des ILV, mais altèrerait plutôt l'internalisation des protéines. En effet, en l'absence du complexe ESCRT-III, les ILV sont néanmoins présentes, mais elles sont plus petites et moins nombreuses (Stuffers, Brech et al. 2009; Babst 2011).

- *Protéines de la famille des tétraspanines*

Plus récemment, il a été montré que des protéines transmembranaires, les tétraspanines, étaient aussi impliquées dans la formation des ILV et dans la sélection des molécules à internaliser (Pant, Hilton et al. 2012; Rana, Yue et al. 2012). Découvertes dans les années 90, les tétraspanines forment une grande famille protéique, très conservée au cours de l'évolution, et sont pour la plupart exprimées à



**Figure 16** Structure des tétraspanines  
*d'après Levy and Shoham 2005*

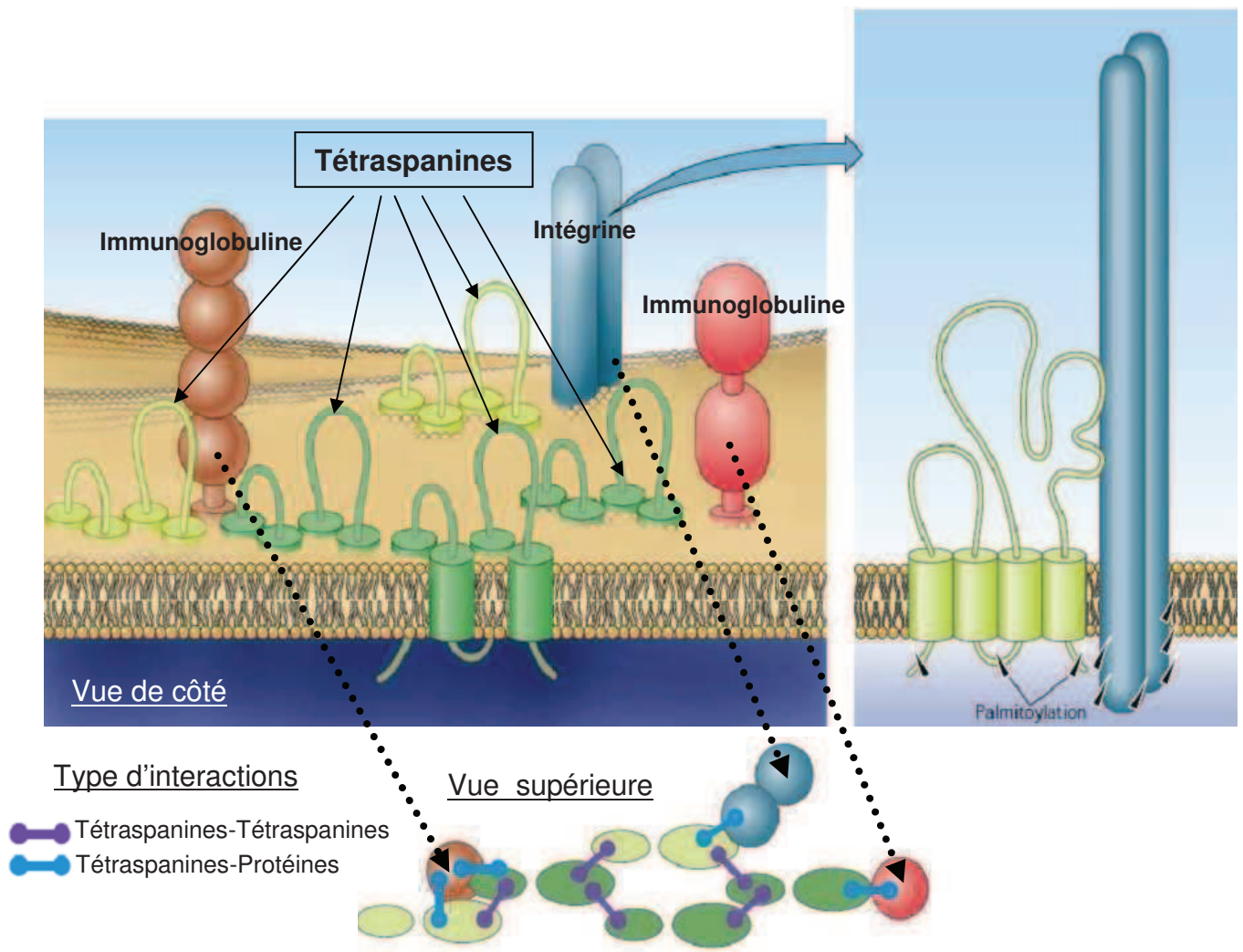


la surface des cellules, et sont également présentes en quantités importantes dans des compartiments intracellulaires, comme les endosomes (Berditchevski 2001; Boucheix and Rubinstein 2001; Charrin, Manie et al. 2002; Yang, Claas et al. 2002; Yunta and Lazo 2003; Yanez-Mo, Barreiro et al. 2009; Salaun, Greaves et al. 2010; Verweij, Middeldorp et al. 2012). Au nombre de 33 chez l'Homme, ces protéines semblent avoir des rôles biologiques majeurs pour la cellule (Charrin, le Naour et al. 2009). La première protéine caractérisée est CD63 (CD : cluster ou classe de différenciation) (Hemler 2003; Hemler 2005). L'utilisation de séquences d'acides aminés connues pour être communes aux tétraspanines déjà identifiées, a permis de découvrir les tétraspanines NET 1 à NET 7 (Serru, Dessen et al. 2000), et Tspan 1 à Tspan 6 (Todd, Doctor et al. 1998). La famille regroupe des tétraspanines de poids moléculaires variables : la plus petite est CD9 de 24 kDa et la plus grosse est CD82 (80 kDa) (Charrin, le Naour et al. 2009).

Les tétraspanines sont également présentes au niveau de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique, en plus de la membrane des MVE (Levy and Shoham 2005). Constituées de 204 à 355 acides aminés, les tétraspanines possèdent quatre régions protéiques, caractéristiques des membres de cette famille (Figure 16) (Boucheix and Rubinstein 2001) qui sont :

- ◆ Quatre domaines transmembranaires (TM1→ TM4) hydrophobes hautement conservés parmi les différents orthologues protéiques. Des résidus polaires (Asparagine 'Asn' (TM1), Glutamine 'Gln' et acide glutamique 'Glu' (TM3 et TM4)) conservés sont retrouvés dans les domaines transmembranaires 1, 3 et 4 (Maecker, Todd et al. 1997; Hemler 2003). Les domaines transmembranaires sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes, assurant ainsi la stabilisation de la protéine. Certaines protéines de cette famille sont nommées TM4SF (transmembrane 4 superfamily) en référence à ces quatre domaines transmembranaires (Yang, Claas et al. 2002; Hemler 2003).

- ◆ Deux boucles extracellulaires : EC1 la plus petite (20 à 28 acides aminés) et EC2 la plus grande (76 à 131 acides aminés) (Boucheix and Rubinstein 2001). Ces deux boucles extracellulaires contiennent des résidus caractéristiques très conservés au cours de l'évolution et parmi les espèces (Yunta and Lazo 2003). Le domaine



**Figure 17 Exemple d'interactions protéiques d'un réseau de tétraspamines**  
*d'après Levy and Shoham 2005*

EC2 possède 4 à 8 cystéines, retrouvées parmi toutes les protéines de la famille, qui forment des ponts disulfures et stabilisent ainsi la conformation de la boucle (Charrin, le Naour et al. 2009). Deux de ces cystéines sont retrouvées dans le motif cystéine-cystéine-glycine (CCG) (Levy and Shoham 2005). Le nombre de ponts disulfures permet de classer les tétraspanines en 3 groupes :

- classe I : deux ponts disulfures (CD81, CD9 et CD53...),
- classe II : classe majoritaire à trois ponts disulfures (CD37, CD82, CD151),
- classe III : quatre ponts disulfures (Tspan-5, Tspan-10 et Tspan-15).

♦ Du côté intracellulaire, la protéine possède une petite boucle de 5 acides aminés reliant les domaines 2 et 3 transmembranaires (Levy and Shoham 2005).

♦ Les extrémités amino (N-) et carboxy (C-) terminales sont courtes et comprennent moins de vingt acides aminés (Levy and Shoham 2005).

Les tétraspanines peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui permettent de conserver une intégrité protéique au cours de l'adressage intracellulaire (Salaun, Greaves et al. 2010; Verweij, Middeldorp et al. 2012). Parmi ces modifications, on retrouve la glycosylation (N-glycosylation) au niveau des boucles extracellulaires EC1 et EC2 (principalement), la myristoylation (ajout de l'acide myristique C14 :0 sur un résidu glycine), et la palmitoylation (modification post-traductionnelle, également réversible, assurée par l'appareil de Golgi) (Yang, Claas et al. 2002; Yang, Kovalenko et al. 2004). L'incorporation du palmitate (C16 :0) sur les résidus cystéines intracellulaires des extrémités N- et C- terminales par une liaison covalente thioester, modifie les propriétés d'agrégation des tétraspanines, modifiant ainsi leur organisation en réseau, ainsi que la flexibilité de ce dernier (Berditchevski 2001; Boucheix and Rubinstein 2001; Charrin, Manie et al. 2002; Yang, Claas et al. 2002; Yunta and Lazo 2003; Yanez-Mo, Barreiro et al. 2009; Salaun, Greaves et al. 2010; Verweij, Middeldorp et al. 2012). CD9 et CD81 sont les tétraspanines les plus palmitoylées (Charrin, Manie et al. 2002). Les tétraspanines peuvent également être ubiquitinyllées (Charrin, le Naour et al. 2009).

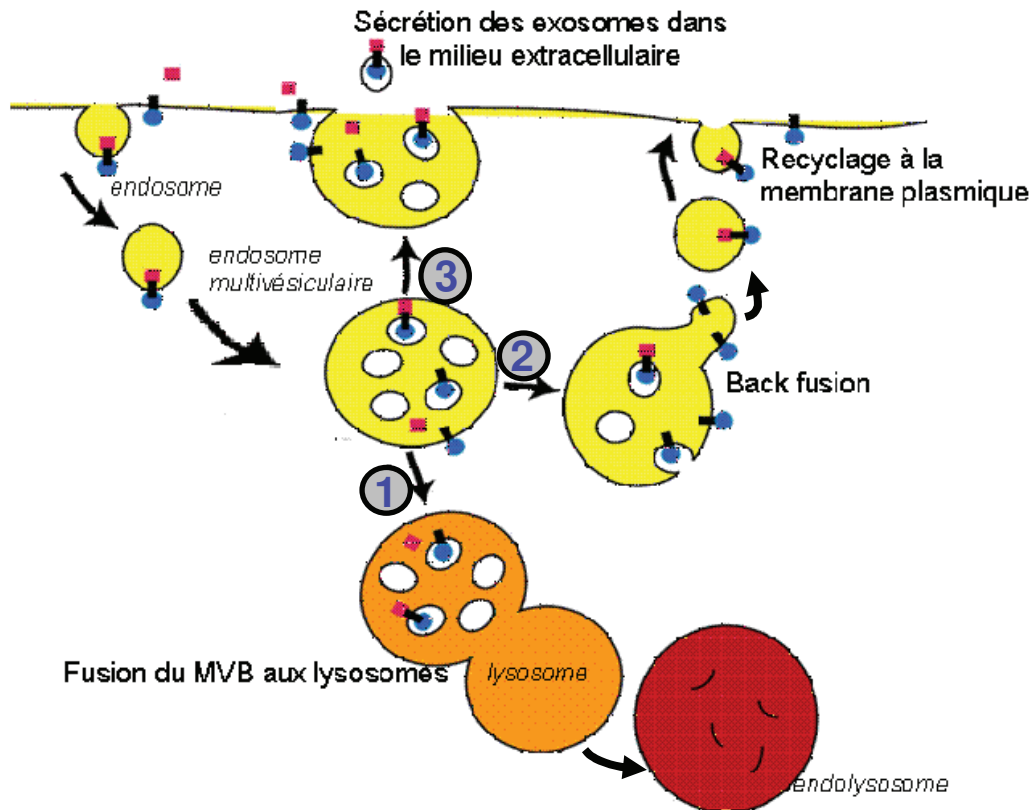
Les tétraspanines ne sont pas des protéines transmembranaires isolées, mais sont retrouvées associées avec d'autres membres de la superfamille, et également

avec de nombreux partenaires protéiques constituant ainsi de grands complexes multimoléculaires, « le réseau de tétraspanines » (Tableau 3). Le réseau de tétraspanines forme des microdomaines membranaires (Figure 17) (Boucheix and Rubinstein 2001; Yunta and Lazo 2003; Levy and Shoham 2005). Malgré la présence de cholestérol, sphingomyéline et gangliosides, ces microdomaines sont distincts des radeaux lipidiques, parce qu'ils ne contiennent pas de protéines classiquement associées aux rafts (protéines membranaires à ancrage GPI ou cavéoline) (Hemler 2005; Levy and Shoham 2005, Berditchevski, 2007 #2793; Le Naour, Andre et al. 2006), (Berditchevski and Odintsova 2007).

Le réseau de tétraspanines joue aussi un rôle dans diverses fonctions cellulaires importantes comme l'interaction cellules-cellules, l'adhérence à la matrice extracellulaire, la migration cellulaire, la signalisation intracellulaire et la fusion cellulaire (Boucheix and Rubinstein 2001; Hemler 2003; Levy and Shoham 2005). Les tétraspanines sont également impliquées dans des processus de remaniement membranaire : modulation de la courbure de la membrane lipidique et régulation des processus de fusion et de fission vésiculaire (Charrin, le Naour et al. 2009).

Au niveau de la membrane limitante des MVE, le réseau de tétraspanines semble impliqué dans le bourgeonnement interne de la membrane limitante conduisant ainsi à la formation des ILV (Verweij, Middeldorp et al. 2012). Un motif d'internalisation de type 'YXXΦ' (Y : tyrosine, X : acide aminé variable et Φ : acide aminé hydrophobe), présent au niveau de l'extrémité C-terminale intracellulaire de certaines tétraspanines, conduit à leur accumulation à la membrane des MVE (Berditchevski and Odintsova 2007; Charrin, le Naour et al. 2009). Ce motif permet également l'interaction des tétraspanines avec les sous-unités de complexes protéiques impliquées dans la voie endosomale (protéines AP notamment) (Hemler 2003; Wubbolts, Leckie et al. 2003; Le Naour, Andre et al. 2006; Berditchevski and Odintsova 2007; Charrin, le Naour et al. 2009).

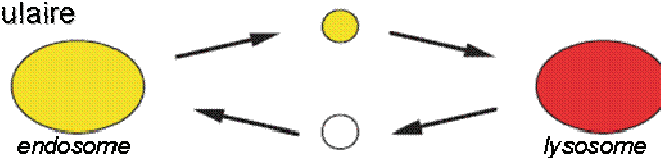
Enfin, ces protéines sont également impliquées dans la fusion des MVE avec la membrane plasmique, conduisant à la libération des ILV, sous forme d'exosomes. L'utilisation de siRNAs dirigés contre les messagers codant des tétraspanines, induit une diminution de la sécrétion des exosomes (Verweij, Middeldorp et al. 2012). Les



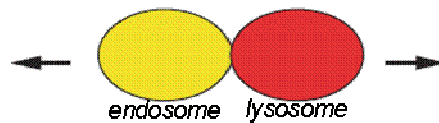
**Figure 18** Les trois devenir possibles des ILV décrites à ce jour et qui sont détaillées dans le texte

*d'après Von Bartheld and Altick 2011*

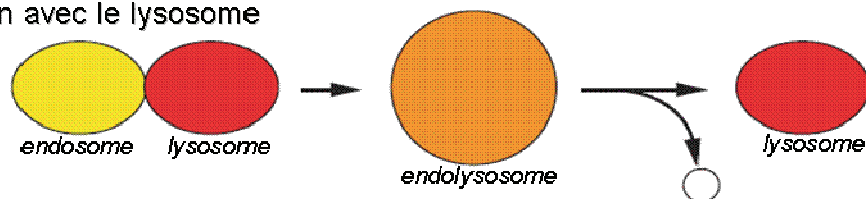
- Transport vésiculaire



- Kiss and Run



- Fusion avec le lysosome



**Figure 19** Les trois mécanismes de dégradation du contenu des MVE par les lysosomes, décrits à ce jour

*d'après Luzio et al. 2000*

tétraspanines seraient aussi impliquées dans la capture des exosomes par les cellules cibles (décrit dans le paragraphe **IV.1.2 Rôle important des tétraspanines**).

### **II.2.3.b Devenir des ILV contenues dans les MVE**

Les ILV ont trois destinations possibles que nous allons décrire : une dégradation par les lysosomes, un stockage temporaire ou leur sécrétion dans le milieu extracellulaire sous la forme d'exosomes (Figure 18) (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008). Les facteurs impliqués dans la régulation de la destination des MVE ne sont pas clairement définis et compris à ce jour. Cependant, il semblerait que les protéines SNARE (SNAP (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protéin) receptor) soient impliquées (Denzer, Kleijmeer et al. 2000).

#### **II.2.3.b.1 Dégradation des ILV par les lysosomes**

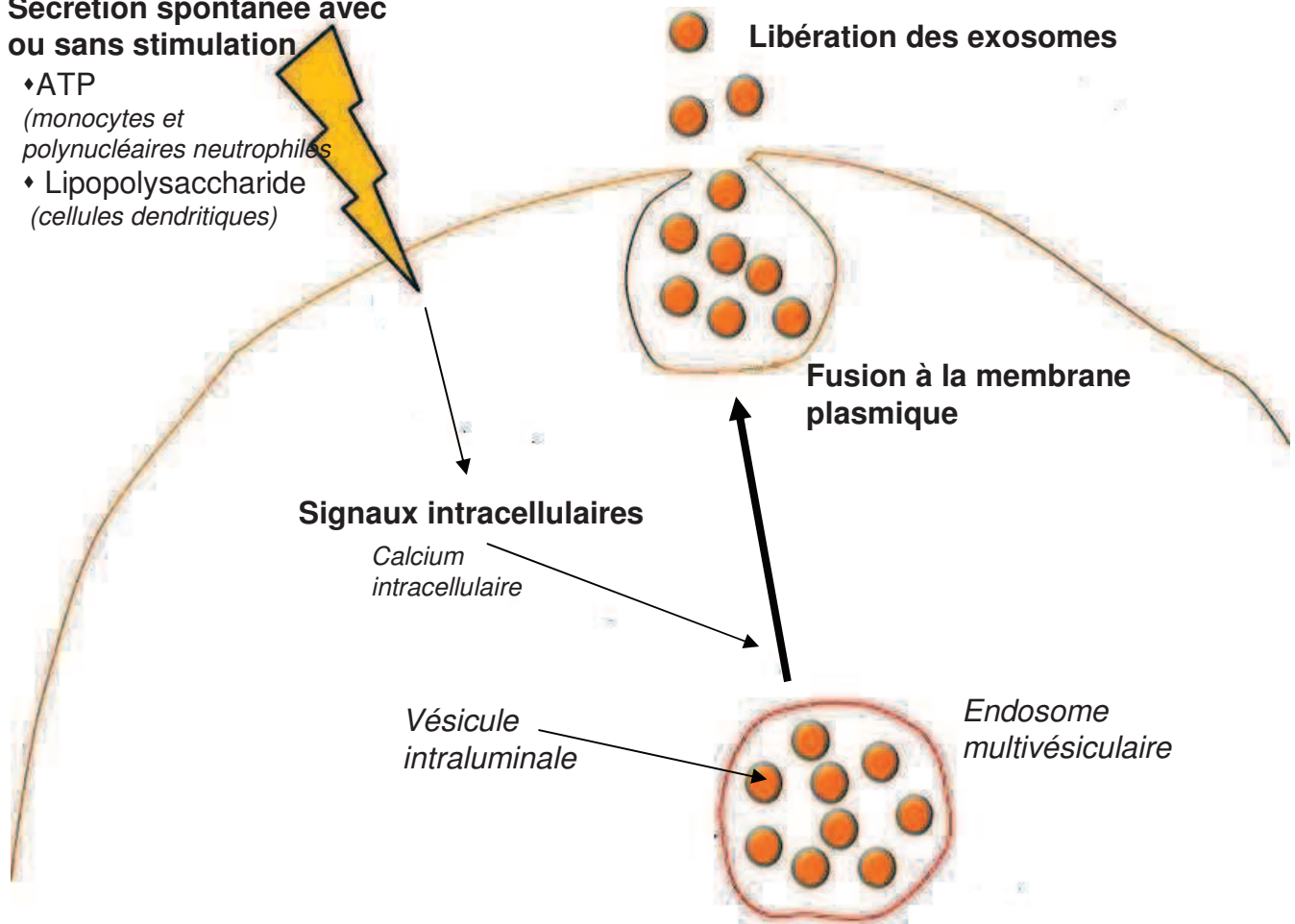
A ce jour, la fusion ou non des MVE aux lysosomes n'est pas encore clairement définie. Il semblerait que les MVE enrichis en PI3P et contenant des protéines ubiquitinyllées soient destinés à être dégradés par les lysosomes, tandis que ceux enrichis en LBPA échapperaient à la dégradation (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008). La fusion des MVE avec les lysosomes entraîne la dégradation des protéines et des lipides contenues dans les ILV, par les hydrolases acides retrouvées dans les lysosomes (cas 1 de la Figure 18) (Bright, Gratian et al. 2005).

Trois mécanismes de fusion des MVE aux lysosomes sont décrits à ce jour (Figure 19) :

- transport vésiculaire entre l'endosome et le lysosome (sous le contrôle des protéines SNARE, de Rab5 et de Rab7) (Stenmark 2009; Hsu, Morohashi et al. 2010),
- fusions répétées et transitoires (pores) entre les 2 organelles (kiss-and-run)

**Sécrétion spontanée avec ou sans stimulation**

- ♦ ATP  
*(monocytes et polynucléaires neutrophiles)*
- ♦ Lipopolysaccharide  
*(cellules dendritiques)*



**Figure 20** Sécrétion des exosomes suite à la fusion du MVE à la membrane plasmique  
*d'après Hu et al. 2012*

- fusion conduisant à la formation d'un compartiment hybride, l'endolysosome, suivie d'une fission pour reformer les lysosomes (Luzio, Rous et al. 2000; Bright, Gratian et al. 2005).

### **II.2.3.b.2 Stockage temporaire des ILV et back-fusion**

Les MVE peuvent également jouer un rôle de stockage pour les molécules internalisées. C'est le cas pour les molécules CMH de classe II complexées aux peptides antigéniques dans les cellules dendritiques. Une fusion des ILV (« back-fusion »), enrichies en complexes CMH-II/peptides antigéniques, avec la membrane endosomale permet un enrichissement de ce complexe immunogénique à la membrane endosomale. Cette dernière émet des bourgeonnements externes conduisant à la formation de vésicules qui vont fusionner *in fine* avec la membrane plasmique. Cette fusion permet la présentation de l'antigène par les molécules de classe II, à la surface de la cellule (cas 2 de la Figure 18) (Kleijmeer, Ramm et al. 2001; Murk, Stoorvogel et al. 2002; van der Goot and Gruenberg 2006; Von Bartheld and Altick 2011).

### **II.2.3.b.3 Sécrétion des ILV dans le milieu extracellulaire : libération des exosomes**

Les MVE peuvent aussi directement fusionner avec la membrane plasmique. Les ILV sont alors libérées dans le milieu extracellulaire, et prennent alors le nom d'exosomes (cas 3 de la Figure 18 et Figure 20).

Les exosomes sont sécrétés par une majorité de types cellulaires et leur libération dans le milieu extracellulaire est un processus constitutif, qui est dépendant du calcium intracellulaire et du pH dans toutes les cellules (Denzer, Kleijmeer et al. 2000; Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002; Fevrier and Raposo 2004; Schorey and Bhatnagar 2008; Cocucci, Racchetti et al. 2009; Gyorgy, Szabo et al. 2011; Silverman and Reiner 2011). Les protéines régulatrices du cytosquelette et les moteurs moléculaires comme la myosine jouent aussi un rôle préalable à ce



processus de fusion, en permettant la migration des MVE à la membrane plasmique (Pant, Hilton et al. 2012).

La fusion des MVE à la membrane est dépendante de :

- *Les céramides*

La membrane des MVE est enrichie en sphingomyéline, précurseur des céramides (réaction catalysée par une enzyme spécifique, la N-SMase (neutral sphingomyelinase)). Une inhibition de cette enzyme entraîne une diminution de la sécrétion des exosomes (Bianco, Perrotta et al. 2009; Bobrie, Colombo et al. 2011; Kharaziha, Ceder et al. 2012; Wang, Dinkins et al. 2012). En accord, une augmentation de l'activité de l'enzyme SMS (sphingomyelin synthase), qui permet la synthèse de sphingomyéline à partir des céramides, entraîne une diminution de la sécrétion des exosomes (Yuyama, Sun et al. 2012). Ces données suggèrent que les céramides soient impliqués dans la libération des exosomes (Trajkovic, Hsu et al. 2008; Kharaziha, Ceder et al. 2012).

- *Les protéines Rab*

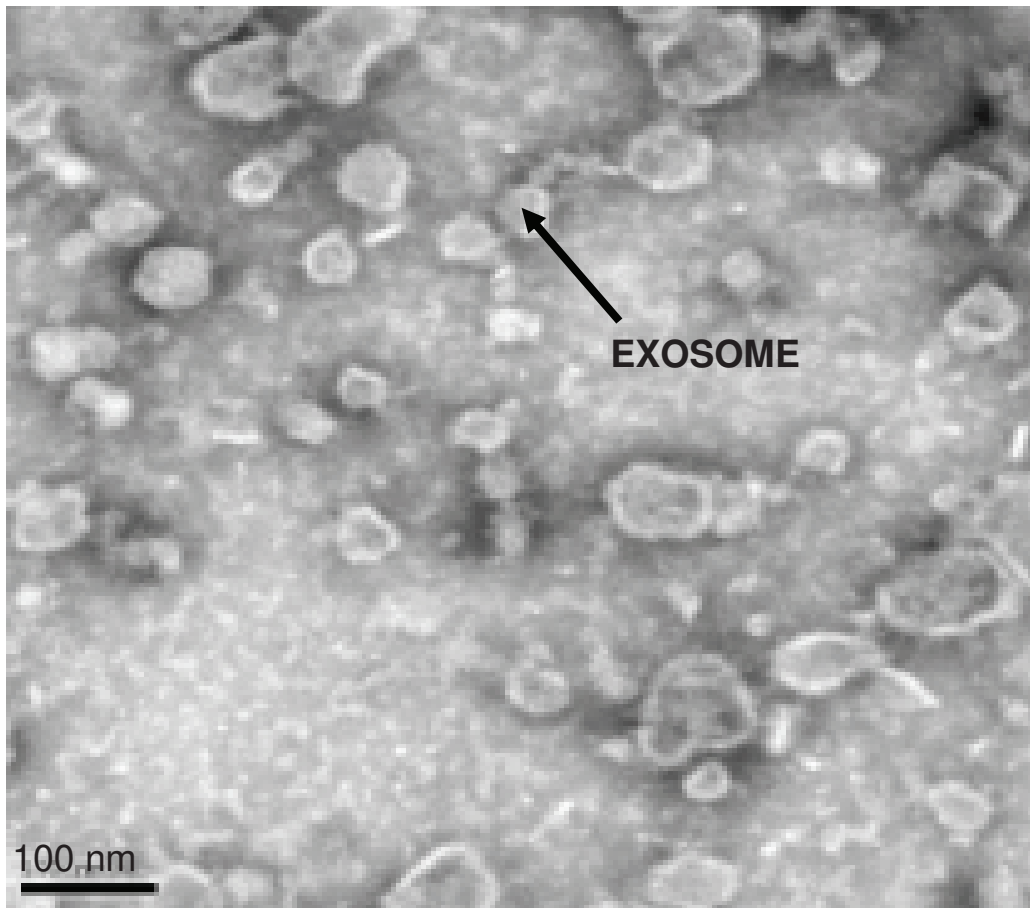
Les protéines Rab ne participent pas à proprement parler à la formation des exosomes, mais jouent plutôt un rôle dans la fusion des MVE avec la membrane plasmique (Tableau 1) (Ostrowski, Carmo et al. 2010; Pfeffer 2010; Kharaziha, Ceder et al. 2012). A ce jour, les mécanismes mettant en jeu les protéines Rab ne sont pas encore complètement décrits, mais il semblerait que les protéines Rab27a et Rab27b soient impliqués dans la fusion des MVE à la membrane plasmique de la cellule (Ostrowski, Carmo et al. 2010; Escrevente, Keller et al. 2011). La protéine Rab27a permet de faire le lien entre les MVE et les moteurs moléculaires nécessaires au déplacement des MVE le long des filaments d'actine. L'absence de la protéine Rab27a conduit à une augmentation de la taille des MVE, due à une accumulation des ILV non libérées. La protéine Rab27b permet le transfert des MVE situés au niveau des microtubules aux filaments d'actine, qui vont permettre sa localisation au niveau de la membrane plasmique. L'absence de la protéine Rab27b entraîne une localisation périnucléaire des MVE, empêchant ainsi sa fusion à la membrane plasmique (Ostrowski, Carmo et al. 2010).

Les protéines Rab11 et Rab35 semblent également intervenir dans l'interaction entre les membranes des MVE et la membrane plasmique, en permettant l'accrochage et la fusion des MVE à la membrane plasmique en présence de calcium (Savina, Vidal et al. 2002; Fader, Savina et al. 2005; Savina, Fader et al. 2005; Thery, Ostrowski et al. 2009; Hsu, Morohashi et al. 2010; Hosseini-Beheshti, Pham et al. 2012). La perte fonctionnelle de ces deux protéines entraîne une accumulation des ILV dans les MVE (dont le nombre est fixe), due à l'absence de fusion des MVE à la membrane plasmique (Hsu, Morohashi et al. 2010; Hu, Drescher et al. 2012).

- *Le calcium intracellulaire*

Le calcium  $Ca^{++}$  intracellulaire est impliqué, de manière générale dans tous les mécanismes de fusion membranaires au cours de la voie endosomale et notamment dans la sécrétion des exosomes (augmentation localisée et transitoire) (Carafoli 2002; Cullen and Lockyer 2002; Savina, Furlan et al. 2003; Savina, Fader et al. 2005; Hoffman, Perkumas et al. 2009). Des études basées sur l'utilisation d'ionophores et de chélateurs calciques confirment l'impact du calcium sur la sécrétion des exosomes. Par exemple, l'entrée de calcium, par les canaux membranaires calciques de la famille P2X, induit la production d'inositol-triphosphate (IP3) qui va entraîner la libération calcique des stocks contenus dans le réticulum endoplasmique. L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire déclenche la sécrétion des exosomes dans le milieu extracellulaire (Savina, Vidal et al. 2002; Savina, Furlan et al. 2003; Savina, Fader et al. 2005; Qu and Dubyak 2009). Au contraire, le blocage d'échangeurs d'ions impliqués dans l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, entraîne une inhibition de la sécrétion des exosomes (Savina, Furlan et al. 2003; Bobrie, Colombo et al. 2011; Kharaziha, Ceder et al. 2012).

Les annexines sont des protéines solubles capables de lier les lipides membranaires, comme la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylcholine (PC) et le phosphatidylinositol en présence de calcium. Elles sont impliquées dans les processus d'endocytose (annexine 6), et d'interactions de la membrane des endosomes au cytosquelette (microtubules et filaments d'actine) (Chasserot-Golaz,



**Figure 21** Exosomes de cellules musculaires murine de C2C12 observés en ME  
(coloration négative)

*Photo du laboratoire*

Vitale et al. 2005). Les annexines A1, A2 et A6 sont présents dans les différents compartiments endosomaux. L'annexine 1 (retrouvée au niveau de la membrane plasmique et à la membrane des endosomes) est impliquée dans la formation des ILV. L'annexine 2 (également retrouvée au niveau de la membrane plasmique et à la membrane des endosomes) joue un rôle important dans la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs le long des microtubules et permet aussi la localisation des MVE au niveau de la membrane plasmique (Gerke, Creutz et al. 2005; Futter and White 2007). A l'inverse, l'annexine 6 (retrouvée à la membrane des endosomes tardifs) permet la colocalisation et la fusion des MVE aux lysosomes (Gerke and Moss 2002; Futter and White 2007; Valapala and Vishwanatha 2011).

- *Le pH*

Le pH régule également la libération des exosomes. Au niveau des masses tumorales, où l'environnement extracellulaire a un pH acide, une libération accrue d'exosomes est observée. Cet environnement acide semblerait aussi favoriser la capture des exosomes par les cellules (Parolini, Federici et al. 2009; Kharaziha, Ceder et al. 2012).

## **III Les exosomes**

Ayant décrit les différents processus cellulaires qui aboutissent à la libération des exosomes par les cellules, nous allons à présent décrire les caractéristiques morpho-biochimiques des exosomes, avant de nous intéresser plus particulièrement à leur composition.

### **III.1 Caractéristiques morphologiques et biochimiques**

Sécrétés par tous les types de cellules aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques, les exosomes apparaissent comme des vésicules

sphériques, en forme de coupe ('cup-shaped') en ME (Figure 21) (Yang and Robbins 2011). Les exosomes correspondant aux ILV contenues dans les MVE, les caractéristiques biochimiques et biophysiques des exosomes sont celles des ILV (Thery, Ostrowski et al. 2009).

Les exosomes sont des vésicules constituées d'une bicouche lipidique d'un diamètre moyen compris entre 30 et 100 nanomètres (la taille des exosomes est dépendante du type cellulaire qui les sécrète) et leur densité est comprise entre 1,13 et 1,19 g/ml (Thery, Zitvogel et al. 2002; Thery, Ostrowski et al. 2009; Yang and Robbins 2011). Le diamètre minimal des exosomes est dépendant des caractéristiques morpho-biochimique de la bicouche lipidique. D'une épaisseur d'environ 5 nanomètres, la rigidité de la bicouche permet de former des vésicules dont la taille minimale ne peut être que de 30 nanomètres environ. Concernant leur diamètre maximal, les exosomes proviennent des MVE dont la taille est comprise entre 200 et 500 nanomètres. Leur diamètre maximal ne peut excéder 100 nanomètres (Vlassov, Magdaleno et al. 2012).

Du fait de la fourchette de taille des exosomes, le volume luminal est estimé à environ  $0,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^3$  (Sverdlov 2012). Une estimation de la quantité de protéines et d'acide nucléique a par ailleurs été déterminée. Le contenu exosomal contiendrait moins de 100 protéines et moins de 10000 nucléotides constitutifs des mRNAs et miRNAs) (Vlassov, Magdaleno et al. 2012) tandis qu'une autre étude qui prend en compte le volume moyen d'un mRNA de 1000 nucléotides de  $3 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^3$ , estime qu'un exosome pourrait contenir environ 1000 mRNAs (du fait de la présence également de protéines, lipides et de miRNAs) (Sverdlov 2012). Cette dernière étude a également estimé la quantité de protéines retrouvées dans un exosome. En partant du postulat qu'une cellule animale a un diamètre moyen compris entre 10 et 20  $\mu\text{m}$ , le ratio [volume de la cellule animale]/[volume exosome] est d'environ  $10^6$ . Etant donné qu'une cellule possède une masse protéique moyenne de 0.5 ng, un exosome contiendrait une masse protéique de  $0,5 \cdot 10^{-9} \mu\text{g}$  (Sverdlov 2012). Par conséquent, 1  $\mu\text{g}$  de protéines d'exosomes coïnciderait avec  $2 \cdot 10^9$  exosomes (Sverdlov 2012).

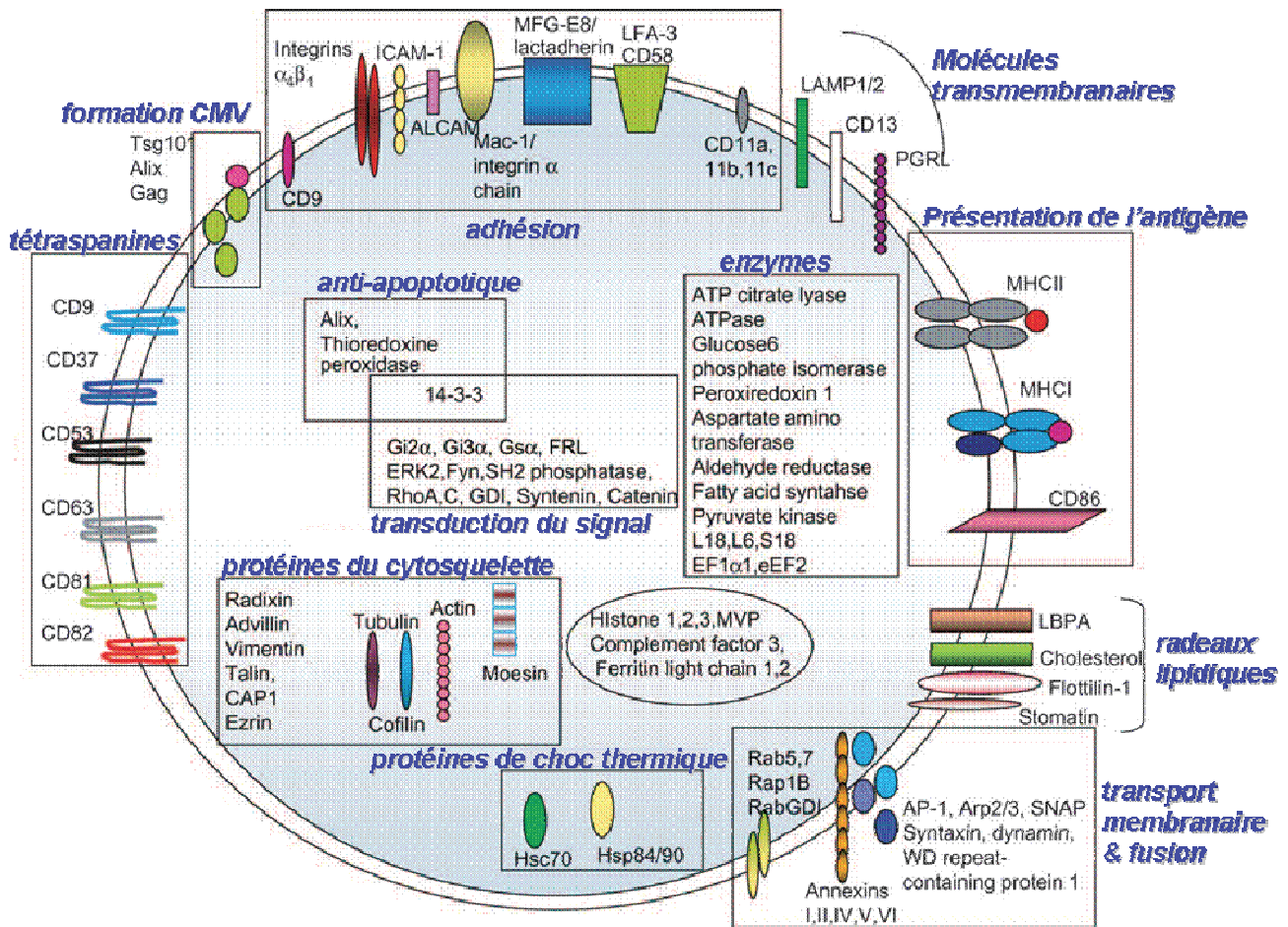
## III.2 Composition des exosomes

Entourée d'une bicouche lipidique, la lumière des exosomes est une fraction cytosolique, dépourvue d'organelles comme les mitochondries, les lysosomes, le réticulum endoplasmique, noyau ou encore l'appareil de Golgi (Hu, Drescher et al. 2012). A leur découverte, le contenu exosomal était considéré comme des déchets éliminés par la cellule (protéines obsolètes ou mal conformées). Par la suite l'hypothèse que ce contenu reflétait l'abondance stœchiométrique non spécifique de protéines et d'acides nucléiques présents dans le cytoplasme a été proposée (Skog, Wurdinger et al. 2008). Enfin, l'hypothèse actuelle est l'implication des exosomes dans la communication intercellulaire (Ratajczak, Wysoczynski et al. 2006; Mathivanan and Simpson 2009; Pant, Hilton et al. 2012).

La composition des exosomes est dépendante de leur origine cellulaire, et de l'état physiologique de la cellule qui les sécrète (Ratajczak, Wysoczynski et al. 2006; Pant, Hilton et al. 2012). Devant l'abondance des publications listant les différentes molécules internalisées dans les exosomes, une banque de données a été développée en 2009 par Suresh Mathivanan et Richard J. Simpson (La Trobe University, Victoria, Australie). Cette banque de donnée appelée ExoCarta recense toutes les études portant sur la caractérisation des protéines, des acides nucléiques (mRNA et miRNA) et des lipides contenus dans les exosomes parmi plusieurs espèces et types cellulaires (ExoCarta <http://exocarta.org/index.html>) (Mathivanan and Simpson 2009; Mathivanan, Fahner et al. 2012).

### III.2.1 Composition protéique des exosomes

La base de données Exocarta regroupe plus de 4500 protéines différentes qui ont été retrouvées dans les exosomes issus de différentes sources (ExoCarta <http://exocarta.org/index.html>). Parmi ces protéines, il faut distinguer les protéines ubiquitaires que l'on retrouve dans tous les exosomes sécrétés (majoritairement des protéines impliquées dans la biogenèse des exosomes) et celles qui sont spécifiques du type cellulaire et du statut physio-pathologique de la cellule au moment de la



**Figure 22** Liste des protéines retrouvées de façon ubiquitaire dans les exosomes d'après Schorey and Bhatnagar 2008

formation des ILV (Freyssinet 2003; Keller, Sanderson et al. 2006; Chen, Guo et al. 2011; Valapala and Vishwanatha 2011; Yang and Robbins 2011).

Quel que soit le type cellulaire d'où ils sont originaires, les exosomes ont une composition protéique commune qui permet de les caractériser comme des vésicules dérivées de la voie endosomale, et plus particulièrement des protéines retrouvées dans les MVE (Pelchen-Matthews, Raposo et al. 2004). L'étude des protéines communément retrouvées dans les exosomes a révélé une spécificité de la population protéique présente : aucune mitochondriale ou du réticulum endoplasmique n'est retrouvée dans les exosomes. Bien que des protéines nucléaires (facteurs d'élongation et histones) soient parfois observées dans les échantillons, ces protéines sont probablement des contaminants protéiques issus des corps apoptotiques, qui sont isolés en même temps que les exosomes (Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002; Thery, Zitvogel et al. 2002; Mears, Craven et al. 2004; Keller, Sanderson et al. 2006).

De par leur origine endosomale, tous les exosomes contiennent des protéines membranaires impliqués dans le transport et la fusion (GTPases Rab2/Rab7, annexines A1/A2/A5/A6, flotillines, les tétraspanines (CD9, CD63, CD81, CD82 principalement)), les protéines de choc thermique (Hsc70, Hsp 90), les protéines impliquées dans la biogenèse des MVE (Alix, Tsg101), ainsi que les protéines ancrées à la membrane via le groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (AChE) et celles associées aux radeaux lipidiques (CD55, CD59) (Subra, Grand et al. 2010; Vlassov, Magdaleno et al. 2012). D'autres protéines sont également communément retrouvées, parmi lesquelles des molécules d'adhésion (ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), CD11 (a, b et c), CD18, CD58 (ou LFA-3), CD146 et CD16), la clathrine, des intégrines, des protéines du cytosquelette (actine, tubuline et moésine), le complexe majeur d'histocompatibilité CMH-I, des protéines impliquées dans le processus d'apoptose (thioredoxine peroxidase II, 14-3-3, galectine 3) et diverses enzymes, des facteurs d'élongation et protéines impliquées dans la signalisation (peroxidases, pyruvate kinases, lipide-kinases, enolase-1, GADPH, EEF1A1 eucaryotic elongation factor 1)... (Figure 22) (Berditchevski and Odintsova 1999; Thery, Regnault et al. 1999; Berditchevski 2001; Katzmann, Babst et al. 2001; Skokos, Le Panse et al. 2001; Thery, Boussac et al. 2001; van Niel, Raposo et al. 2001; Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002; Thery, Zitvogel et al. 2002;



Charrin, Manie et al. 2003; Hemler 2003; Wubbolts, Leckie et al. 2003; Fevrier and Raposo 2004; Mears, Craven et al. 2004; Pelchen-Matthews, Raposo et al. 2004; Gastpar, Gehrman et al. 2005; Keller, Sanderson et al. 2006; van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006; Schorey and Bhatnagar 2008; Raiborg and Stenmark 2009; Simons and Raposo 2009; Staubach, Razawi et al. 2009; Pfeffer 2010; Chaput and Thery 2011; Escrevente, Keller et al. 2011; Record, Subra et al. 2011; Kharaziha, Ceder et al. 2012). Les tétraspanines et les protéines Alix et Tsg101 sont considérées comme des marqueurs protéiques exosomaux (Camussi, Deregibus et al. 2011).

D'autres protéines sont spécifiquement retrouvées dans les exosomes selon le type cellulaire qui les sécrète (notamment les cellules du système immunitaire). A titre d'exemple, on retrouve le CMH de type II (cellules présentatrice d'antigènes, APC), les molécules de co-stimulation CD86 (APC), CD41 (GPIIb ou facteur de von Willebrand, plaquettes), CD3 (lymphocytes), les protéines TLR (toll-like receptor, lymphocytes) ; mais aussi les enzymes liées à la mort cellulaire (perforine et granzyme) pour les exosomes des lymphocytes T cytotoxiques. Sont également retrouvées de façon tissu-spécifique, les cytokines et chémokines et les sous-unités du glutamate pour les exosomes sécrétés par les neurones... (Heijnen, Schiel et al. 1999; Thery, Boussac et al. 2001; Blanchard, Lankar et al. 2002; Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002; Fevrier and Raposo 2004; Mears, Craven et al. 2004; Caby, Lankar et al. 2005; Segura, Amigorena et al. 2005; Veron, Segura et al. 2005; Keller, Sanderson et al. 2006; van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006; Schorey and Bhatnagar 2008; Simons and Raposo 2009; Pfeffer 2010; Chen, Guo et al. 2011; Escrevente, Keller et al. 2011).

### **III.2.2 Composition lipidique des exosomes**

La base de données ExoCarta liste également tous les lipides identifiés dans les exosomes. A ce jour, 194 lipides ont été répertoriés dans cette banque (ExoCarta <http://exocarta.org/index.html>).

Les exosomes ont une origine endosomale. La composition lipidique de leur membrane est donc celle des MVE, elle-même issue de la membrane plasmique où

l'endocytose a eu lieu. Au niveau de la bicouche lipidique des membranes cellulaires eucaryotes, les phospholipides sont asymétriquement répartis : la couche externe est enrichie en phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline tandis que la couche interne est composée d'aminophospholipides, de phosphatidylsérine (PS) et de phosphatidyléthanolamine (PE). La distribution de ces lipides membranaires est un processus contrôlé par des enzymes régulant la translocation des phospholipides (scramblases, flippases et floppases) (Morel, Jesel et al. 2011).

Deux invaginations membranaires surviennent au cours du processus de biogenèse des exosomes conduisant ainsi à la même orientation des protéines transmembranaires présentes à la membrane des exosomes que celles présentes au niveau de la membrane plasmique (Fevrier and Raposo 2004; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008; Pant, Hilton et al. 2012). La première invagination survient au niveau de la membrane plasmique lors de l'endocytose, et la seconde invagination se déroule à la membrane des MVE, conduisant à la formation des ILV (Pant, Hilton et al. 2012). Toutefois si les protéines transmembranaires ont la même orientation entre les membranes plasmique et vésiculaire, l'asymétrie lipidique de la membrane plasmique n'est pas retrouvée au niveau de la membrane des exosomes. En effet, le PE (enrichi au niveau couche interne de la membrane plasmique) est retrouvé aussi bien au niveau de la couche cytosolique que luminale de la membrane exosomale. Les autres phospholipides semblent également distribués aléatoirement entre les deux couches lipidiques, rompant ainsi avec l'asymétrie lipidique observée au niveau de la membrane plasmique (Subra, Laulagnier et al. 2007).

Ainsi, les lipides constitutifs de la membrane des exosomes sont :

- les diglycérides
- les phospholipides > phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, lysophosphatidylcholine, l'acide lyso-bis phosphatidique
- les sphingolipides > céramides, sphingomyéline
- le cholestérol
- les gangliosides > GM3 principalement

(Wubbolts, Leckie et al. 2003; Laulagnier, Motta et al. 2004; Pelchen-Matthews, Raposo et al. 2004; Caby, Lankar et al. 2005; Subra, Laulagnier et al. 2007; Schorey and Bhatnagar 2008; Pfeffer 2010; Escrevente, Keller et al. 2011; Valapala and Vishwanatha 2011; van Dommelen, Vader et al. 2012)

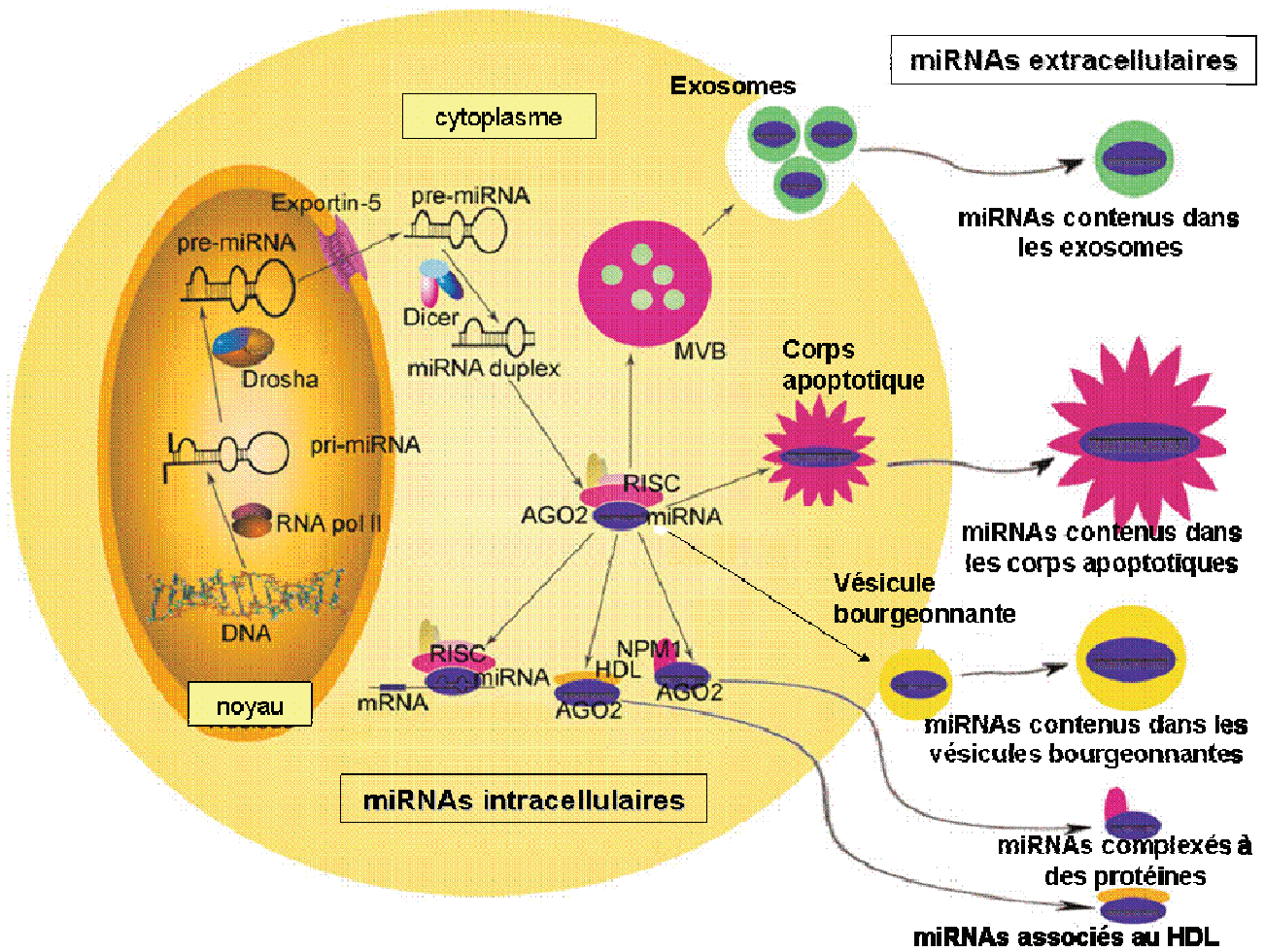
La composition lipidique particulière des exosomes (pauvre en PC et riche en sphingomyéline et cholestérol) leur permet d'avoir une membrane beaucoup plus rigide que celle de la membrane plasmique d'une cellule (Laulagnier, Grand et al. 2004; Trajkovic, Hsu et al. 2008; Mitchell, Welton et al. 2009; Eldh, Lotvall et al. 2012; Kooijmans, Vader et al. 2012). Enfin, le tri des lipides dans les ILV est dépendant de leur queue hydrophobe (cas du LBPA incorporé dans les ILV) (Kobayashi, Beuchat et al. 1999; Mukherjee and Maxfield 1999; Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002). Une autre population de vésicules, les 'exosomes-like vesicles', est également décrite dans la littérature. Bien qu'elles soient fréquemment confondues avec les exosomes, ces vésicules ont une origine commune de biogenèse mais se différencient de celles-ci par l'absence de microdomaines de radeaux lipidiques à la membrane de la vésicule (Thery, Ostrowski et al. 2009; Gyorgy, Szabo et al. 2011).

### **III.2.3 Les carbohydrates**

Les exosomes comportent des résidus saccharidiques au niveau de leur couche lipidique externe. Cette dernière est enrichie en mannose, polylactosamine, acide alpha-2,6 sialique et en complexes N-glycannes. Des travaux récents semblent indiquer qu'ils participeraient au tri et à la reconnaissance des glycoprotéines et des glycolipides entre les exosomes et les cellules cibles (Batista, Eng et al. 2011; Vlassov, Magdaleno et al. 2012).

### **III.2.4 Composition en acides nucléiques des exosomes**

La découverte de la présence de matériel génétique sous forme d'acide ribonucléique (ARN messenger et microARNs) dans les exosomes, par l'équipe de Lötvall travaillant sur les vésicules sécrétées par les mastocytes, a laissé penser que les exosomes pourraient jouer un rôle de véhicule pour le transfert horizontal de



**Figure 23** Les différentes formes de miARNs extracellulaires décrites à ce jour  
*d'après Chen et al. 2012*

l'information génétique entre les cellules (Fevrier and Raposo 2004; Deregibus, Cantaluppi et al. 2007; Valadi, Ekstrom et al. 2007; Burghoff, Ding et al. 2008; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008; Bobrie, Colombo et al. 2011; Thery 2011; Vickers and Remaley 2012).

Ces molécules nucléiques sont abondantes dans les exosomes (environ 1300 ARNm et 121 miRNAs dans les exosomes produits par les mastocytes murins et humains) (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008; Sverdlov 2012). Dans ExoCarta, plus de 1600 ARNm et 700 miRNAs sont répertoriés (ExoCarta <http://exocarta.org/index.html>). Récemment, une équipe a aussi identifié la présence d'ARN antisens naturels des gènes LRRC24, MDM2 and CDKN1A, dans les exosomes sécrétés par les cellules de trois lignées de cancer colorectaux (CRC) (Chiba, Kimura et al. 2012).

Les exosomes ne contiendraient pas d'ADN (Valadi, Ekstrom et al. 2007). Toutefois, deux études ont montré la présence d'ADN au sein des exosomes : ADN mitochondrial dans les exosomes sécrétés par les myoblastes de la lignée murine C2C12 (Guescini, Guidolin et al. 2010), et de l'ADN génomique (Balaj, Lessard et al. 2011). Plusieurs formes de miARNs extracellulaires sont à ce jour décrites dans la littérature, dont les miARNs incorporés dans les exosomes (Figure 23) (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Zerneck, Bidzhekov et al. 2009; Kosaka, Iguchi et al. 2010; Zhang, Liu et al. 2010);

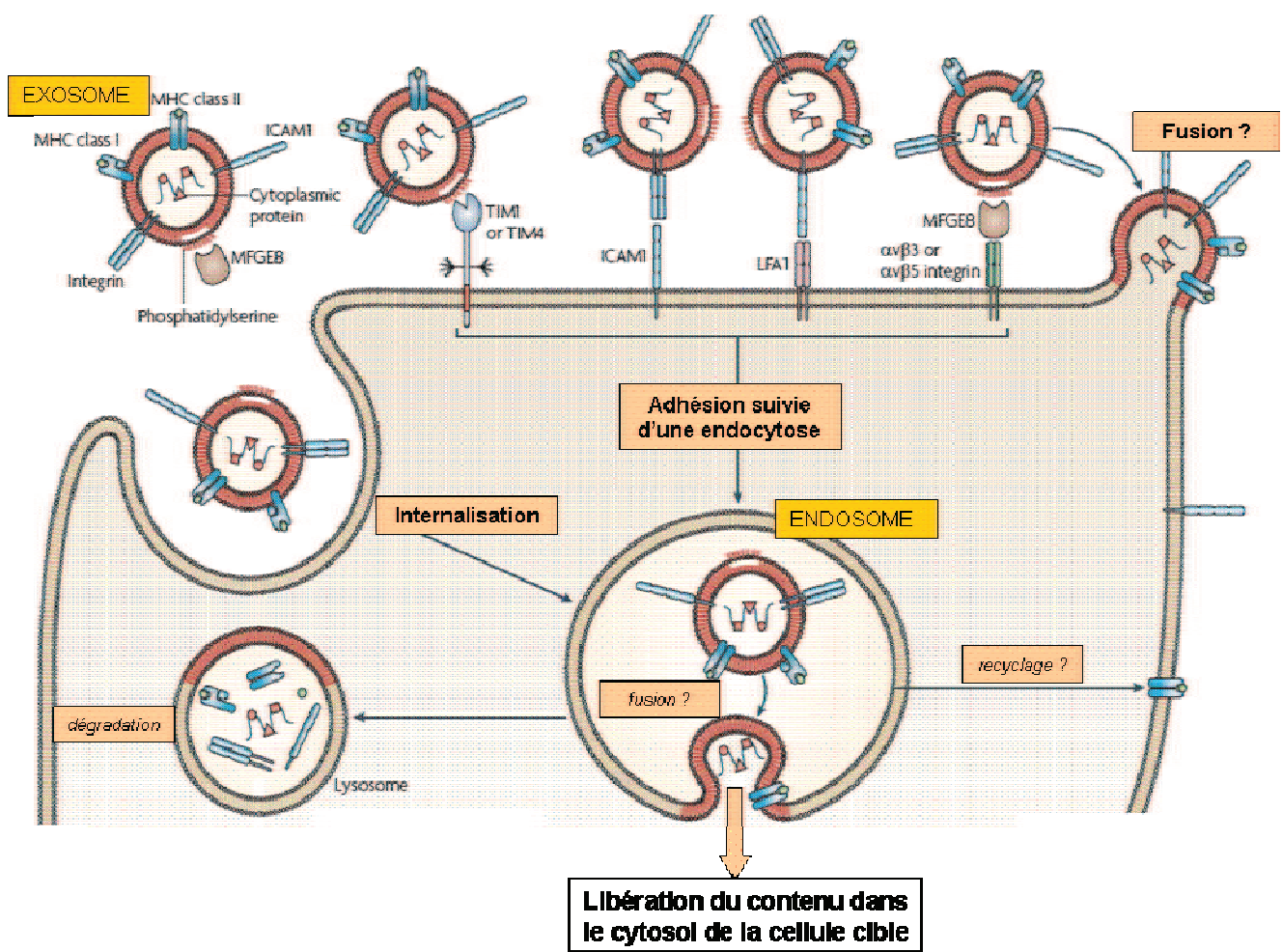
Le processus d'incorporation des miARNs dans les exosomes serait dépendant des céramides (Kosaka, Iguchi et al. 2010; Kosaka, Iguchi et al. 2010). Déjà impliqués dans la formation des vésicules endosomales (Trajkovic, Hsu et al. 2008), ils joueraient également un rôle dans l'incorporation spécifique des miARNs dans les exosomes (Wang, Zhang et al. 2010; Vickers and Remaley 2012). Comme précédemment décrit, leur biosynthèse est régulée par l'enzyme nSMase2. La répression par un inhibiteur biochimique de l'action de la nSMase2 (GW4869), ou par des siARNs, réduit la quantité de miARNs incorporés et sécrétés par les exosomes. A l'inverse, une surexpression de l'enzyme entraîne une augmentation de la quantité de miARNs exportés dans les exosomes (Kosaka, Iguchi et al. 2010; Kosaka, Iguchi et al. 2010; Vickers and Remaley 2012).

Les MVE sont aussi en collaboration étroite avec le complexe RISC impliqué dans la genèse des miARNs (**décrit dans le paragraphe II.1 Rappels sur les**

**miARNs de la partie « Travaux Personnels »**) (Siomi and Siomi 2009; Pant, Hilton et al. 2012), ce qui permettrait d'expliquer leur internalisation dans les exosomes (Arroyo, Chevillet et al. 2011; Pant, Hilton et al. 2012; Vickers and Remaley 2012). Les compartiments de stockage des miARNs (GW-bodies) interagissent aussi avec les MVE, et sembleraient également impliqués dans l'incorporation des miARNs dans les exosomes. En effet, les protéines caractéristiques des GW-bodies (Ago2 et GW182) sont également retrouvées dans les exosomes (Gibbings, Ciaudo et al. 2009). A l'inverse, les compartiments P-bodies, également impliqués dans le stockage des miARNs, n'interagiraient pas avec les MVE et ne participeraient pas à l'incorporation des miARNs dans les exosomes. En effet, la protéine DCP1A retrouvée dans les P-bodies, serait absente des exosomes (Gibbings, Ciaudo et al. 2009).

Bien que les protéines de la machinerie ESCRT ne semblent pas indispensables à l'incorporation des miARNs dans les ILV, il semblerait que ces protéines puissent s'associer aux protéines effectrices de la biosynthèse des miARNs (Lee, Pressman et al. 2009; Kosaka, Iguchi et al. 2010). Il en découle l'hypothèse que les MVE seraient un carrefour essentiel au devenir du miARN : son export via les exosomes hors de la cellule ou son action de répresseur de la transcription ribonucléique au sein de la cellule, sans que les mécanismes soient bien connues à ce jour (Kosaka, Iguchi et al. 2010). D'autant plus, que si la majorité des miARNs est retrouvée dans le cytoplasme, certains sont uniquement retrouvés dans les exosomes, suggérant un tri actif de ces derniers lors de la formation des ILV (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008).

Trois populations de microARNs sont retrouvées : les miARNs présents aussi bien dans le cytoplasme cellulaire que dans les exosomes, ceux qui sont uniquement présents dans la cellule et ceux qui sont uniquement exportés (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Skog, Wurdinger et al. 2008; Taylor and Gercel-Taylor 2008; Rabinowits, Gercel-Taylor et al. 2009; Kogure, Lin et al. 2011; Mittelbrunn, Gutierrez-Vazquez et al. 2011; Hu, Drescher et al. 2012; Kharaziha, Ceder et al. 2012).



**Figure 24 Mécanismes possibles d'entrée des exosomes par la cellule cible**  
*d'après Théry et al. 2009*

## **IV Mécanismes de capture des exosomes par les cellules cibles**

De nombreuses études suggèrent que les exosomes sont des médiateurs de la communication intercellulaire, en transférant notamment leur contenu protéique et nucléique dans le cytoplasme de la cellule qui les capture (Ratajczak, Wysoczynski et al. 2006; Valadi, Ekstrom et al. 2007; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008; Cocucci, Racchetti et al. 2009; Yang and Robbins 2011; van Dommelen, Vader et al. 2012). Le transfert de leur contenu suggère que les exosomes doivent interagir avec les cellules cibles. Toutefois le(s) mécanisme(s) mis en jeu pour ce processus de capture et de libération du contenu exosomal est (Lee, Pressman et al.) à ce jour mal défini(s) et expliqué(s) (Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002; van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008; Feng, Zhao et al. 2010).

Deux grandes hypothèses découlent de plusieurs études sur le sujet : soit les exosomes sont internalisés par la cellule (Fitzner, Schnaars et al. 2011; Vickers and Remaley 2012), soit une fusion directe des membranes exosomale et plasmique de la cellule cible se produit et conduit à la libération du contenu exosomal dans le cytoplasme (Figure 24) (Denzer, Kleijmeer et al. 2000; Parolini, Federici et al. 2009; Thery, Ostrowski et al. 2009; Tian, Wang et al. 2010; Escrevente, Keller et al. 2011; Yang and Robbins 2011; Eldh, Lotvall et al. 2012; Montecalvo, Larregina et al. 2012).

### **IV.1 Adhésion des exosomes à la membrane plasmique de la cellule receveuse**

#### **IV.1.1 Interaction spécifique de type « ligand-récepteur »**

Les exosomes sécrétés par un type cellulaire particulier présentent à leur surface des molécules d'adhésion caractéristiques de la cellule qui les a sécrétés (Camussi, Deregibus et al. 2011). L'adhésion des exosomes à la membrane plasmique pourrait se faire par une interaction protéique et/ou lipidique type ligand-



récepteur. Ce mécanisme n'est pas encore, à ce jour, complètement compris et décrit. Certaines protéines spécifiques des cellules cibles (EUR, pour Exosomes Uptake Receptors) joueraient le rôle de récepteurs spécifiques des exosomes en interagissant avec des phospholipides (phosphatidylsérine en l'occurrence) et/ou des protéines présentes au niveau de la membrane exosomale (Miyanishi, Tada et al. 2007; Cocucci, Racchetti et al. 2009; Thery, Ostrowski et al. 2009; Mathivanan, Ji et al. 2010; Escrevente, Keller et al. 2011; van Dommelen, Vader et al. 2012).

Les exosomes peuvent être capturés par les cellules cibles selon un mécanisme de reconnaissance spécifique type ligand-récepteur (Losche, Scholz et al. 2004; Camussi, Deregibus et al. 2011). Par exemple, les protéines Tim (T-cell Immunoglobulin- and mucin-domain-containing Molecule) retrouvées à la membrane des lymphocytes T sont des récepteurs des phosphatidylsérines (Miyanishi, Tada et al. 2007; Thery, Ostrowski et al. 2009; Kharaziha, Ceder et al. 2012). La protéine Tim4 interagit avec les intégrines, les annexines, la galectine ou encore la protéine ICAM1 (Rana and Zoller 2011; Pant, Hilton et al. 2012). D'autres protéines immunogéniques seraient également impliquées dans le recrutement des exosomes par les cellules immunitaires ; LFA-1 (leucocyte function associated antigen) pour la capture d'exosomes sécrétés par les cellules dendritiques par les lymphocytes T (Nolte-t Hoen, Buschow et al. 2009; Kharaziha, Ceder et al. 2012) et ICAM-1 pour l'internalisation des exosomes par les cellules présentatrices d'antigènes (Segura, Amigorena et al. 2005; Kharaziha, Ceder et al. 2012).

## **IV.1.2 Rôle des tétraspanines**

Les tétraspanines apparaissent également être des molécules nécessaires à l'interaction des exosomes avec la membrane plasmique des cellules cibles (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Pant, Hilton et al. 2012). La spécificité de l'interaction entre les tétraspanines et les autres partenaires protéiques est régie par la boucle extracellulaire EC2 (Figure 16) (Charrin, Manie et al. 2002; Stipp, Kolesnikova et al. 2003; Yunta and Lazo 2003; Charrin, le Naour et al. 2009).

Les tétraspanines peuvent interagir avec d'autres tétraspanines (Boucheix and Rubinstein 2001; Charrin, le Naour et al. 2009). Généralement les interactions les mieux caractérisées sont celles mettant en jeu les tétraspanines les plus ubiquitaires (comme CD9, CD81 ou CD151) bien que d'autres tétraspanines moins ubiquitaires comme CD82 ou CD53 peuvent également être retrouvées dans ces interactions inter-tétraspanines (Yunta and Lazo 2003).

Les tétraspanines peuvent également interagir avec d'autres protéines (Tableau 3). Parmi celles-ci, l'association des protéines de la famille des intégrines avec les tétraspanines est l'interaction la plus étudiée et la mieux caractérisée par des expériences de co-immunoprécipitation (Berditchevski 2001; Yunta and Lazo 2003). Onze intégrines différentes sont décrites pour pouvoir interagir avec différentes tétraspanines, les principales étant celles qui possèdent la sous-unité  $\beta 1$ , sous-unité majeure des intégrines impliquées dans l'interaction à la matrice extracellulaire (laminine notamment) (Berditchevski 2001; Boucheix and Rubinstein 2001; Yanez-Mo, Barreiro et al. 2009). La variabilité des isoformes protéiques mis en jeu pour chacune des deux superfamilles permet d'aboutir à différentes combinaisons de complexes protéiques qui influenceraient la capture des exosomes par les cellules cibles spécifiques. Par exemple, les exosomes exprimant les protéines Tspan8 et les intégrines possédant une sous-unité  $\alpha 4$ , sont plus spécifiquement internalisés par les cellules endothéliales et pancréatiques qui expriment le ligand CD54, nécessaire à leur reconnaissance (Rana and Zoller 2011; Rana, Yue et al. 2012). De la même façon, les intégrines qui possèdent les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , permettent l'accrochage des exosomes aux cellules cibles par l'intermédiaire de la protéine ICAM1 (Thery, Ostrowski et al. 2009).

Le blocage fonctionnel des tétraspanines et des intégrines présentes à la membrane exosomale par des anticorps spécifiques, réduit jusqu'à 30% la capture des exosomes par les cellules cibles. Ceci confirme le rôle important de ces protéines pour l'accrochage des exosomes avec la cellule cible (Morelli, Larregina et al. 2004; Thery, Ostrowski et al. 2009).

Les tétraspanines interagissent aussi avec les immunoglobulines (CD2, CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CMH-I et CMH-II ...), les protéoglycannes (syndecan, CD44), les protéines régulatrices du complément (CD21, CD46), les récepteurs aux facteurs de croissance, divers ligands (récepteur EGF (epidermal growth factor), c-kit,

proTGFR, proHeparin Binding-EGF (proHB-EGF)) et d'autres molécules diverses (CD19, g-glutamyl transpeptidase, ADAM10...) (Boucheix and Rubinstein 2001; Hemler 2003; Yunta and Lazo 2003).

## **IV.2 Fusion de la membrane des exosomes à la membrane plasmique**

Le processus de fusion directe des membranes a été observé sur des cellules cancéreuses, comme les mélanomes, qui capturent les exosomes par une fusion directe de leur membrane plasmique avec la membrane des exosomes. Les tétraspanines CD9 et CD81 sembleraient impliquées dans le processus de fusion (Montecalvo, Larregina et al. 2012) Ce mécanisme semblerait plus efficace dans un environnement acide (faibles quantités d'oxygène, liée à une vascularisation limitée). Ce processus est principalement observé dans la fusion des exosomes à la membrane de cellules tumorales (Parolini, Federici et al. 2009; Kharaziha, Ceder et al. 2012). Cette fusion directe des membranes permet de libérer directement le contenu de l'exosome dans le cytoplasme de la cellule. Selon l'hypothèse de Parolini, l'absence d'internalisation des exosomes par les cellules cancéreuses permettrait de préserver l'intégrité fonctionnelle du contenu exosomal, qui pourrait être dégradé si les exosomes se retrouvaient dans la voie endosomale (Denzer, Kleijmeer et al. 2000; Berditchevski and Odintsova 2007; Parolini, Federici et al. 2009; Thery, Ostrowski et al. 2009; Tian, Wang et al. 2010; Montecalvo, Larregina et al. 2012).

## **IV.3 Internalisation des exosomes par la cellule cible**

L'entrée des exosomes pourrait se faire par endocytose ou phagocytose. Le mécanisme le plus décrit est la capture des exosomes par phagocytose, notamment

par les cellules phagocytaires (monocytes et macrophages) (Feng, Zhao et al. 2010; Kharaziha, Ceder et al. 2012). L'internalisation des exosomes par phagocytose serait dépendante de la dynamine 2, du réseau d'actine et du PI3K (phosphatidyl inositol-3-kinase) (Feng, Zhao et al. 2010; Vickers and Remaley 2012). Cependant, il semblerait que les exosomes puissent aussi être internalisés par une endocytose dépendante de la clathrine, comme cela a été observé pour la capture des exosomes par les cellules dendritiques (Escrevente, Keller et al. 2011; Kharaziha, Ceder et al. 2012).

Après son endocytose, les exosomes rejoignent la voie endosomale où ils seraient redirigés par le cytosquelette, dans une région périnucléaire au niveau de l'endosome tardif (Tian, Wang et al. 2010; Kharaziha, Ceder et al. 2012). L'hypothèse décrite à ce jour concernant la libération du contenu exosomal dans le cytoplasme cellulaire est la suivante : la libération du contenu découlerait de la fusion des exosomes avec la membrane du compartiment endosomal (les mécanismes ne sont pas encore définis et compris) (Morelli, Larregina et al. 2004; Cocucci, Racchetti et al. 2009; Thery, Ostrowski et al. 2009; Tian, Wang et al. 2010; Escrevente, Keller et al. 2011; Vickers and Remaley 2012).

## **V Rôles physiologiques des exosomes**

Les exosomes suscitent un intérêt grandissant en recherche depuis qu'il a été démontré qu'ils joueraient un rôle important dans les communications intercellulaires. Ainsi, plusieurs études (principalement basées sur des modèles *in vitro*) ont mis en évidence que la libération du contenu des exosomes dans les cellules pourraient, en modulant l'expression des gènes ou des voies de signalisation, induire des changements physiologiques au cours de divers processus physiopathologiques (Shoelson, Lee et al. 2006; Deregibus, Cantaluppi et al. 2007; Al-Nedawi, Meehan et al. 2009; Simons and Raposo 2009; Simpson, Lim et al. 2009; Chairoungdua, Smith et al. 2010; Kharaziha, Ceder et al. 2012; Vlassov, Magdaleno et al. 2012).

## V.1 Régulation de l'expression des gènes

Le transfert horizontal de matériel génétique entre les cellules pourrait influencer sur l'expression génique de la cellule qui capture les exosomes (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008; Schorey and Bhatnagar 2008; Sverdlov 2012). Les exosomes peuvent transférer les ARN messagers à d'autres cellules, où ils peuvent être traduits en protéines fonctionnelles (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Skog, Wurdinger et al. 2008; Rechavi, Erlich et al. 2009; Kosaka, Iguchi et al. 2010). Les microARNs présents dans les exosomes peuvent être transférés et réguler négativement l'expression des ARN messagers et protéines des cellules cibles (Johnstone 2005; Kosaka, Iguchi et al. 2010; Kosaka and Ochiya 2011; Hu, Drescher et al. 2012; Montecalvo, Larregina et al. 2012; van Dommelen, Vader et al. 2012).

Par exemple, les exosomes sécrétés par les cellules endothéliales sont capturés par les cellules musculaires lisses environnantes et sembleraient jouer un rôle protecteur de l'athérosclérose (Hergenreider, Heydt et al. 2012). Les exosomes sécrétés par les cellules endothéliales contiennent les microARNs miR-143 et miR-145. L'injection de ces exosomes dans un modèle murin d'athérosclérose, permet de réduire la formation de la plaque d'athérosclérose (Hergenreider, Heydt et al. 2012).

L'équipe de Jan Lötvall a étudié le contenu des exosomes sécrétés par les mastocytes humains. Environ 116 miARNs et 1800 ARNm ont été identifiés dans les exosomes. Cette étude met aussi en évidence que trois catégories de miARNs sont exprimés par la cellule : ceux qui sont exprimés uniquement par la cellule, ceux qui sont exprimés dans la cellule et qui sont également exportés, et les miARNs qui sont uniquement exportés via les exosomes. Enfin, cette étude a aussi montré que les exosomes de mastocytes pouvaient être capturés par des cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> (marquage fluorescent). En incorporant de l'uridine tritié dans les ARN, l'équipe a aussi montré que les ARN contenus dans les exosomes, étaient transférés dans le cytoplasme des cellules CD34<sup>+</sup> (Ekström, Valadi et al. 2012).

Une autre étude a montré un transfert fonctionnel des miARNs des exosomes sécrétés par les lymphocytes T aux autres cellules présentatrices d'antigènes. Parmi les miARNs transférés, miR-335 est capable de réguler l'expression du gène SOX4 (Mittelbrunn, Gutierrez-Vazquez et al. 2011).

De la même manière, l'étude publiée par Montecalvo et *al.* a aussi montré que le contenu en miARNs des exosomes sécrétés par les cellules dendritiques, pouvaient être transféré à d'autres cellules dendritiques, mais aussi aux lymphocytes T CD4 activés. Ces miARNs (dont miR-451 and miR148a), une fois libérés dans le cytoplasme de la cellule receveuse, sont capables de réguler négativement l'expression des gènes (Montecalvo, Larregina et al. 2012).

Enfin, une autre étude a également montré l'export de miR-92a dans les exosomes sécrétés par les cellules leucémiques. Ces exosomes sont capturés par les cellules endothéliales de la veine ombilicale (cellules HUVEC). Après la capture de ces exosomes, l'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  cible de miR92a est significativement réduite, confirmant un transfert horizontal fonctionnel du contenu des exosomes (Umezu, Ohyashiki et al. 2012).

## **V.2 Activation directe de voies de signalisation**

Des récepteurs membranaires (comme le récepteur 2 de la transferrine, Tfr2), internalisés lors de la biogenèse des exosomes, et qui se retrouvent à la membrane des exosomes, peuvent activer des voies de signalisation comme la voie des MAP (mitogen-activated protein)/ERK (Extracellular regulated protein kinase) kinases ou la voie PI3K/Akt lors de la capture des exosomes par les cellules environnantes (Calzolari, Raggi et al. 2006; Qu, Qu et al. 2009).

Une autre étude a démontré que les tétraspanines CD9 et CD82 favorisent l'internalisation et l'export de la beta-caténine dans les exosomes (Chairoungdua, Smith et al. 2010). L'inactivation de l'expression de CD9, par des expérimentations de knock-out, réduit la concentration en beta-catenine dans les exosomes. L'internalisation dans les exosomes permet de réduire la concentration intracellulaire de la beta-catenine, entraînant ainsi une diminution de l'activation de la voie de signalisation Wnt/beta-catenine. Cette voie de signalisation est surexprimée lors de la tumorigenèse. Les tétraspanines CD9 et C82 permettraient ainsi d'inhiber la formation de métastases, en réduisant l'activation la voie de signalisation Wnt/beta-catenine, via l'export de la beta-catenine dans les exosomes (Chairoungdua, Smith et al. 2010). De la même façon, la tétraspanine CD63 module l'activation de la voie

NFkappa B en exportant la protéine LMP1 (Latent membrane protein-1) dans les exosomes (Verweij, Middeldorp et al. 2012).

### **V.3 Implication des exosomes dans la prolifération et la différenciation cellulaire**

Les exosomes peuvent favoriser la prolifération et la différenciation de certains types cellulaires. Par exemple, les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques seraient capables d'activer et de stimuler la prolifération des cellules Natural Killer, afin de limiter la formation de métastases (Viaud, Terme et al. 2009). Dans le cas du cancer du sein, les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses seraient capables d'inhiber à la fois la différenciation des monocytes en macrophages et des précurseurs myéloïdes en cellules dendritiques, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire (Yu, Liu et al. 2007). De même, les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses sont capables de promouvoir la prolifération des cellules tumorales via l'activation des voies PI3K/Akt et MAP kinases (Qu, Qu et al. 2009) et d'induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, permettant la formation de métastases (Webber, Steadman et al. 2010).

D'autres études ont montré l'implication des exosomes dans des processus de réparation tissulaire. L'injection d'exosomes sécrétés par des cellules souches mésenchymateuses humaines à des modèles murins/porcins de lésions ischémiques, permettraient de réduire la taille de l'infarctus (Lai, Arslan et al. 2010). Une autre étude a montré que les exosomes sécrétés par les cellules souches hématopoïétiques CD34+ seraient capables d'induire une activité angiogénique lors de lésions ischémiques (Sahoo, Klychko et al. 2011).

## V.4 Remodelage du stroma cancéreux

L'étude de l'implication des exosomes dans les processus de carcinogenèse a pris de l'ampleur depuis quinze ans : 475 articles sont référencés sur Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) dont 109 sont des revues scientifiques. Toutes ces études s'accordent sur le fait que les cellules cancéreuses sécrètent des exosomes qui sont associés à une accélération de la croissance et de l'invasion tumorales (Liu, Yu et al. 2006; Clayton, Mitchell et al. 2007; Skog, Wurdinger et al. 2008; Rabinowits, Gercel-Taylor et al. 2009; Friel, Corcoran et al. 2010; Peng, Yan et al. 2011; Rani, O'Brien et al. 2011; Rupp, Rupp et al. 2011; Hu, Drescher et al. 2012).

Il a été postulé que le cœur de la masse tumorale ayant un pH faible (en lien avec une vascularisation et apport en oxygène limités), cette condition favoriserait la sécrétion des exosomes. Ceci pourrait expliquer que les cellules tumorales sécrètent des exosomes (également appelés oncosomes) à des taux supérieurs comparés aux cellules saines (Kharaziha, Ceder et al. 2012; van Dommelen, Vader et al. 2012). Par exemple, chez des patients atteints du cancer du poumon, environ 2,85 mg d'exosomes par mL de plasma sont sécrétés par les cellules cancéreuses, contre environ 0,77 mg d'exosomes par mL de plasma chez des sujets sains (Simpson, Jensen et al. 2008; Simpson, Lim et al. 2009). Le pH acide du milieu extracellulaire favoriserait également la fusion des exosomes issus de cellules tumorales à la membrane plasmique des cellules cibles saines (Parolini, Federici et al. 2009; Marleau, Chen et al. 2012).

Les cellules tumorales sécrètent des exosomes, dont le contenu luminal reflète le statut pathologique de la cellule : présence d'oncoprotéines, d'onco-ARNm et d'onco-microARNs (let-7, miR-1, miR-15, miR-16 and miR-375) mais aussi d'éléments transposables (rétrotransposons LINE1 et Alu) (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Balaj, Lessard et al. 2011; Hosseini-Beheshti, Pham et al. 2012; Kharaziha, Ceder et al. 2012; Somasundaram and Herlyn 2012). Le transfert horizontal de ces 'oncomolécules' aux cellules saines semble moduler plusieurs fonctions biologiques comme la prolifération cellulaire, la migration et l'adhésion (Kharaziha, Ceder et al. 2012). Ces exosomes joueraient par conséquent un rôle dans la propagation et la



croissance tumorale (tumorigenèse) et la formation de métastases par le transfert de leur contenu aux cellules cibles saines (Henderson and Azorsa 2012; Kharaziha, Ceder et al. 2012). Le transfert de ces molécules oncogéniques aurait également une fonction immunosuppressive, et confèrerait outre la tumorigenèse, une résistance thérapeutique aux tumeurs favorisant d'autant plus la formation de métastases (Abusamra, Zhong et al. 2005; Logozzi, De Milito et al. 2009; Marleau, Chen et al. 2012). D'autres études ont montré que les exosomes sécrétés par les cellules tumorales pourraient à la fois induire une réponse immunitaire et réprimer l'activité fonctionnelle des cellules immunitaires (Clayton, Mitchell et al. 2007; They 2011; Bang and Thum 2012). L'étude du contenu protéique (oncoprotéines) et génique (oncomiRNAs) des exosomes pourrait permettre d'identifier de potentiels biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi de l'évolution des tumeurs (Balaj, Lessard et al. 2011; Marleau, Chen et al. 2012).

## **V.5 Régulation de la réponse immunitaire et présentation d'antigènes**

Les exosomes sécrétés par les cellules impliquées dans la réponse immunitaire (lymphocytes B et T, cellules dendritiques, mastocytes, cellules épithéliales de l'intestin...) expriment à leur surface les complexes CMH chargés avec le peptide antigénique. Ils permettent l'échange de l'antigène et des complexes CMH (CMH-I et CMH-II) entre les cellules présentatrices d'antigènes, et d'avoir un rôle immunostimulant (Raposo, Nijman et al. 1996; Wubbolts, Fernandez-Borja et al. 1996; Chaput, Taieb et al. 2005; Schorey and Bhatnagar 2008; Rani, O'Brien et al. 2011).

## **V.6 Transfert de virus et de prions**

Les exosomes sont impliqués dans le transport et la propagation de contenu infectieux (Simpson, Jensen et al. 2008). Les exosomes peuvent transférer aux

cellules environnantes, des protéines virales (Kosaka, Iguchi et al. 2010; Pegtel, Cosmopoulos et al. 2010; Meckes and Raab-Traub 2011) et des prions (Fevrier, Vilette et al. 2005; Vella, Sharples et al. 2007; Hu, Drescher et al. 2012). Il a même été montré que des composants bactériens (lipides membranaires de mycobactérie), issus de cellules infectées, pouvaient être propagés par cette voie (Schorey and Bhatnagar 2008),

La famille des rétrovirus détournerait même toute la machinerie de formation et de capture des exosomes, comme moyen de propager les différentes composantes virales nécessaires à la formation de nouveaux virions (Gould, Booth et al. 2003; Meckes and Raab-Traub 2011). Ce processus viral est décrit sous l'appellation « Hypothèse de Trojan » *“The Trojan exosome hypothesis states that retroviruses use the preexisting, nonviral exosome biogenesis pathway for the formation of infectious particles, and the preexisting, nonviral pathway of exosome uptake for a receptor- independent, Env-independent mode of infection”* (Gould, Booth et al. 2003).

## **V.7 Implication des exosomes dans le développement du diabète de type 2**

Dans la situation du diabète de type 2 (T2DM) et de l'obésité, le tissu adipeux sécrète des exosomes qui sont capables de moduler l'homéostasie des tissus environnants (Ogawa, Tanaka et al. 2010). Dans le modèle *in vivo* de souris *ob/ob*, les exosomes sécrétés par le tissu adipeux sont capables d'induire la différenciation des monocytes en macrophages, qui sécrètent les cytokines TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor) et interleukine IL-6 (Deng, Poliakov et al. 2009). Enfin les exosomes sécrétés par les adipocytes différenciés de souris obèses, injectés à des souris wild-type, stimulent la sécrétion des cytokines TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor) et IL-6 par les macrophages, qui seraient impliqués dans le développement de l'insulino-résistance (Deng, Poliakov et al. 2009; Ogawa, Tanaka et al. 2010). De la même façon, les exosomes sécrétés par les autres tissus insulino-sensibles (comme le foie, le pancréas et le muscle squelettique), pourraient également être impliqués dans le

développement de l'insulino-résistance (Shoelson, Lee et al. 2006; Yoon, Kim et al. 2012).

Le diabète de type 2 est également associé à l'obésité. Dans le tissu adipeux, les exosomes sécrétés par les adipocytes de grosse taille sont capables d'induire la synthèse et le stockage des lipides au sein des adipocytes de petite taille. Les exosomes sécrétés contiennent une information lipogénique (adipokines, leptine et les transcrits correspondants) qui favorisent la synthèse et le stockage des acides gras (Muller, Schneider et al. 2011; Muller, Schneider et al. 2011). Enfin, en situation d'obésité, les exosomes sécrétés par les adipocytes de grosse taille sont capables d'induire l'angiogenèse des cellules endothéliales environnantes. Dans les modèles de souris diet-induced obese (DIO) mice, les exosomes sécrétés par le tissu adipeux ont un enrichissement de facteurs pro-angiogéniques (comme la leptine, le TNF $\alpha$  et les protéines MMP, matrix metalloprotease), qui favorisent la migration et l'invasion cellulaire, nécessaire à la formation de nouveaux vaisseaux (Aoki, Yokoyama et al. 2010).

## **VI Utilisation des exosomes dans la modulation de la réponse cellulaire aux thérapies**

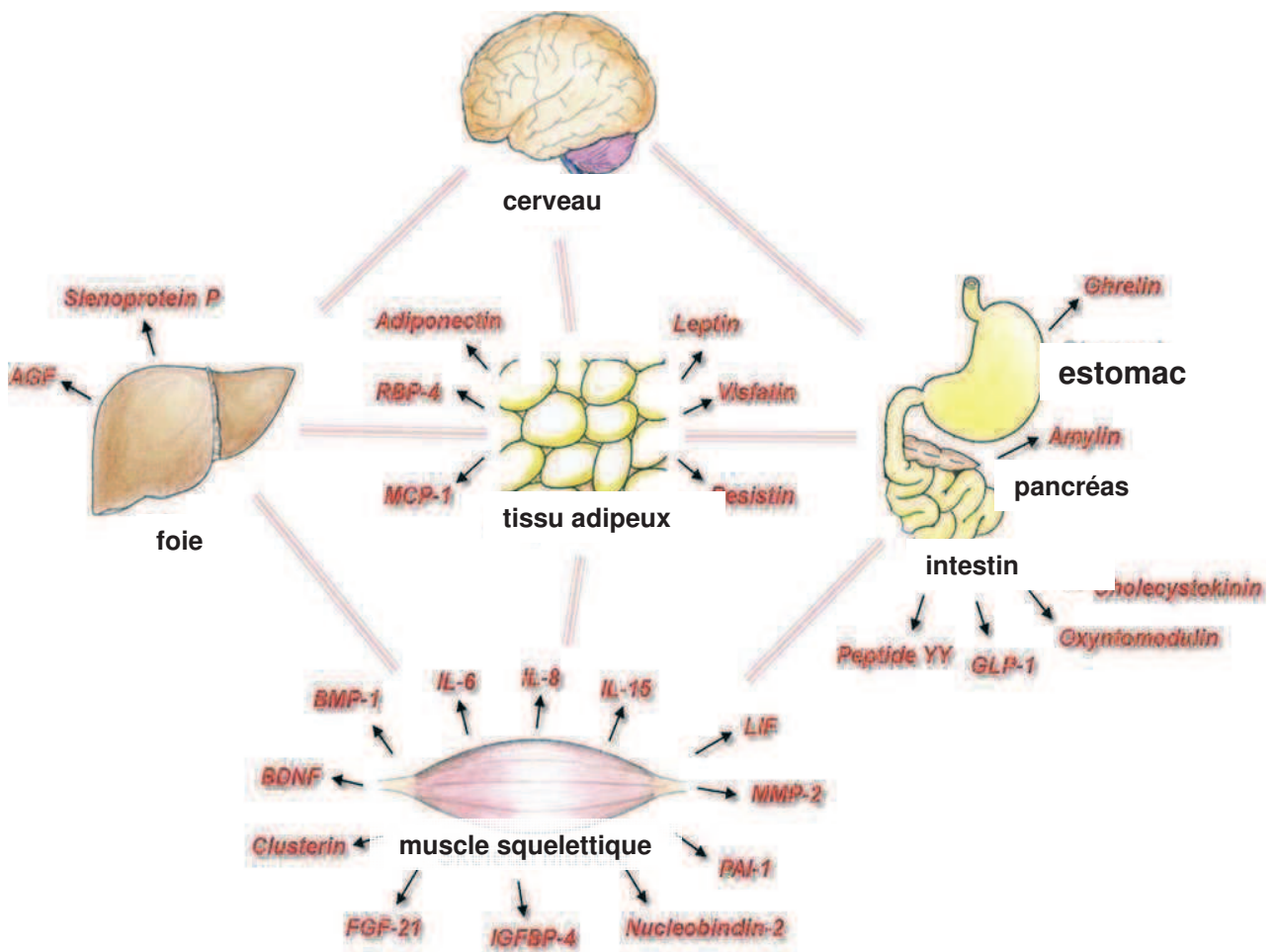
Comme précédemment décrit, les exosomes participent via le transfert de leur contenu luminal à la communication intercellulaire. Il en découle que les exosomes pourraient être utilisés dans différentes applications thérapeutiques (Vlassov, Magdaleno et al. 2012). Une alternative biotechnologique est l'utilisation des exosomes comme vecteurs pour transférer des agents thérapeutiques à des cellules cibles spécifiques.

Dans ce contexte, une étude a montré la faisabilité, du transport et du transfert fonctionnel de siARNs par les exosomes dans une cellule cible spécifique. La protéine Lamp2b est abondamment retrouvée à la membrane des exosomes sécrétés par les cellules dendritiques. Les auteurs ont construit un plasmide capable de produire la protéine qui contient des peptides supplémentaires, qui permettent sa

reconnaissance spécifique à un récepteur retrouvé au niveau des cellules du cerveau. Les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques transfectées expriment la nouvelle protéine membranaire, et sont capturés spécifiquement par les cellules nerveuses du cerveau. En outre, les auteurs ont également réussi à intégrer des siARNs dans ces exosomes isolés par une technique d'électroporation. Ces exosomes chargés en siARNs sont ensuite spécifiquement capturés par les cellules neuronales. Enfin, les siARNs libérés dans le cytoplasme des cellules ont permis la répression de l'expression du gène cible (BACE1) (Alvarez-Erviti, Seow et al. 2011).

Un simulacre synthétique basé sur les nanovésicules (structure sphérique possédant une bicouche lipidique) appelé « liposome » a également été conçu pour pouvoir y internaliser diverses molécules protéiques, nucléiques voire des drogues et les transférer spécifiquement à un type cellulaire (Kooijmans, Vader et al. 2012).

# **TRAVAUX PERSONNELS**



**Figure 25** Sécrétion des myokines par le muscle strié squelettique  
d'après Yoon et al. 2012

# OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Le muscle strié squelettique possède un rôle important dans la communication intercellulaire via la sécrétion de cytokines spécifiques, les myokines (Bortoluzzi, Scannapieco et al. 2006; Henningsen, Rigbolt et al. 2010). Ces protéines solubles sont capables de réguler les différentes étapes de la myogenèse et de régénération musculaire en cas de lésions tissulaires (interleukines, IL-4, IL-7 et IL-13 notamment) (Horsley, Jansen et al. 2003; Haugen, Norheim et al. 2010), mais aussi de moduler l'homéostasie des autres organes insulino-sensibles périphériques, comme le foie, le tissu adipeux et le pancréas (interleukines IL-6, IL-15) (Figure 25) (Bouzakri, Plomgaard et al. 2011; Yoon, Kim et al. 2012).

En plus des cytokines et des autres molécules solubles, les cellules sont capables de sécréter des nanovésicules, les exosomes, qui semblent aussi participer aux dialogues inter-organes au cours des situations physiologiques et pathologiques (van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006; Simons and Raposo 2009; Vlassov, Magdaleno et al. 2012). La composition des exosomes sécrétés, notamment en protéines et en microARNs, pourrait ainsi expliquer leur rôle dans la communication intercellulaire (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Skog, Wurdinger et al. 2008).

Si la sécrétion d'exosomes semble être un processus commun à beaucoup de types cellulaires, au commencement de ce travail de thèse, la sécrétion d'exosomes par les cellules musculaires n'avait jamais été étudiée. Depuis, il a été montré par une approche protéomique, que les myoblastes de la lignée musculaire murine C2C12 sécrétaient des exosomes (Guescini, Guidolin et al. 2010), laissant sous-entendre que le muscle pourrait par ce biais moduler l'homéostasie des autres tissus. Le premier objectif de cette thèse a donc été de déterminer si les cellules musculaires différenciées (les myotubes) pouvaient sécréter des exosomes, et si ces exosomes avaient une composition particulière en lien avec leur origine tissulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé le contenu de ces exosomes (protéines et microARNs) et déterminé si la composition exosomale était modifiée, au cours de la myogenèse comme cela avait été décrit pour le sécrétome des cellules C2C12 au cours de la différenciation (Henningsen, Rigbolt et al. 2010).

Des approches fonctionnelles basées sur l'étude de l'expression de marqueurs précoces de la différenciation myogénique et sur le transfert horizontal de miARNs ont été réalisées afin de déterminer si les exosomes sécrétés par les cellules musculaires au cours de la différenciation étaient impliqués dans le processus de myogenèse.

Ces premiers travaux présentés dans le chapitre 1 « **Caractérisation des exosomes sécrétés par la cellule musculaire et étude de leurs rôles au cours de la myogenèse** » ont permis la rédaction de deux articles. Le premier est en révision dans « *Molecular and Cellular Proteomics* » et le second a été soumis à « *Cell Communication and Signalling* ».

Le deuxième chapitre de mes travaux de thèse repose sur l'étude de la composition des exosomes sécrétés par le muscle squelettique en situation d'insulino-résistance. En effet, la biogenèse d'exosomes et la translocation des vésicules Glut4 à la membrane plasmique associée à la signalisation de l'insuline, empruntent des voies convergentes et nous avons pensé que l'insulino-résistance associée à l'obésité et au diabète de type 2 pouvait affecter aussi la production d'exosomes. L'altération de la synthèse des exosomes pourrait être associée à des modifications de leurs contenus (protéines, miARNs et ARNm) modifiant ainsi leurs actions biologiques.

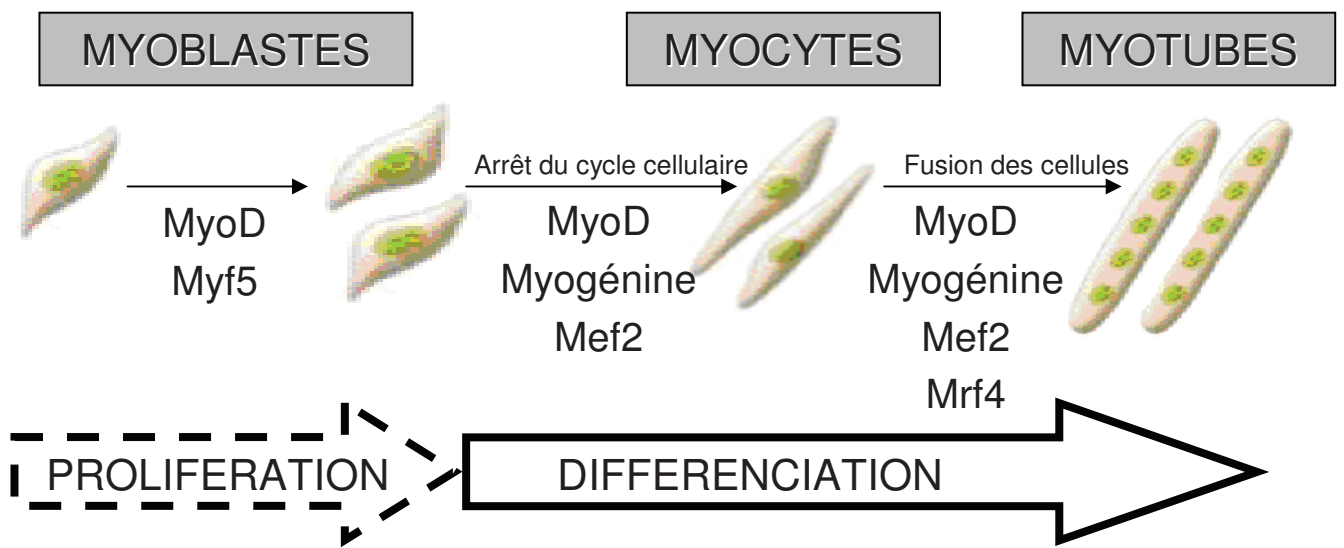
Des travaux indiquent que les acides gras saturés (dont le palmitate) participent au développement de l'insulino-résistance (Dimopoulos, Watson et al. 2006). Son action délétère s'explique par la synthèse *de novo* de céramides à partir du palmitate, qui vont avoir une action inhibitrice sur la protéine kinase B (PKB) (Schmitz-Peiffer, Craig et al. 1999; Chavez and Summers 2003; Ussher, Folmes et al. 2012). Un modèle *in vitro* d'insulino-résistance musculaire a été mis au point sur la même lignée myogénique C2C12 en utilisant le palmitate comme inducteur d'insulino-résistance musculaire, et nous avons étudié la composition en miARNs des exosomes sécrétés.

Les premiers résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 2 « **Etude des exosomes sécrétés par les cellules musculaires en situation d'insulino-résistance induite par le palmitate** ». Ils sont actuellement poursuivis par l'équipe en vue d'une future publication.



# **Chapitre 1**

## **Caractérisation des exosomes sécrétés par la cellule musculaire et étude de leurs rôles au cours de la myogenèse**



**Figure 26** Les principales protéines impliquées au cours de la myogenèse strié squelettique

*d'après Le Grand and Rudnicki 2007*

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

La myogenèse est le processus cellulaire fondamental et complexe qui aboutit à la génération du tissu musculaire, tissu important pour les mammifères de par son abondance (30 à 40% de la masse corporelle) mais aussi par les nombreuses fonctions essentielles qu'il régit (locomotion, thermorégulation, homéostasie énergétique, réserve de protéines et de glucose). Trois grands types de muscles coexistent dans l'organisme : le muscle strié squelettique, le muscle cardiaque et les muscles lisses. La myogenèse du muscle strié squelettique se déroule en deux étapes majeures à partir des précurseurs myogéniques qui apparaissent au cours des premières semaines de l'embryogenèse. Ces deux étapes sont tributaires de la coopération de facteurs protéiques et d'acteurs nucléiques, comme les microARNs (miARNs). Ces différents acteurs moléculaires s'expriment séquentiellement au cours de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

## I Les facteurs protéiques impliqués au cours de la myogenèse

Les précurseurs musculaires subissent une étape de prolifération intensive afin de générer un nombre suffisant de cellules musculaires pour la formation des fibres musculaires, qui complètement différenciées, ne se divisent plus. Plusieurs facteurs de transcription sont essentiels à cette étape de prolifération des myoblastes (les cellules musculaires prolifératrices). Parmi ces protéines clefs, la famille protéique des MRF (Myogenic Regulatory Factors) comprenant les protéines MyoD, Myf5, Myogenin, Mrf4, assurent dans un premier temps une régulation du cycle cellulaire : maintien d'une activité prolifératrice des myoblastes, via les protéines MyoD et Myf5, puis la différenciation des cellules (Figure 26) (Kitzmann and Fernandez 2001; Buckingham, Bajard et al. 2003).

Avant l'initiation de la différenciation myogénique à proprement parler, les myoblastes vont cesser toute activité prolifératrice (cellules quiescentes). Cette étape est contrôlée par des inhibiteurs des protéines kinases dépendantes de la cycline, impliquées au cours du cycle cellulaire. D'autres protéines exprimées répriment aussi

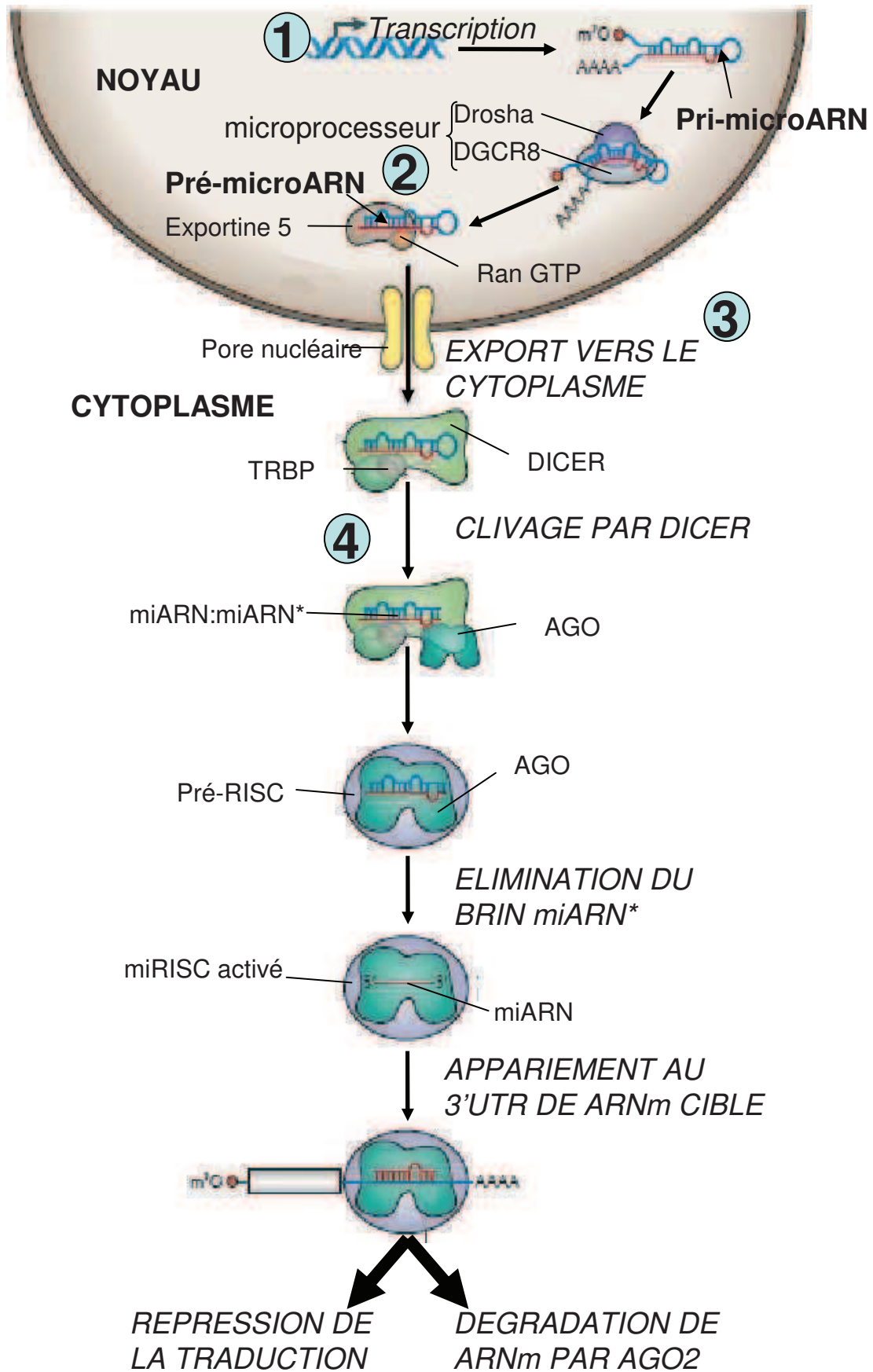
l'expression de régulateurs négatifs de la différenciation myogénique (myostatine, par exemple) (Joulia-Ekaza and Cabello 2006). La différenciation musculaire est initiée par les protéines de la famille MRF. Après Myf5 et MyoD, également impliquées dans l'arrêt de la prolifération, la myogénine et Mrf4 sont ensuite activées pour permettre la différenciation musculaire (Figure 26) (Valdez, Richardson et al. 2000; Buckingham and Montarras 2008; Buckingham and Vincent 2009; Buckingham and Desplan 2010). L'initiation de la différenciation est également tributaire de l'expression coordonnée des facteurs de la famille MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2). Absents avant l'induction de la différenciation, leur expression augmente dès l'arrêt de la prolifération, l'alignement et la fusion des myoblastes pour donner les cellules musculaires multinucléées (les myotubes) (Figure 26). Les myotubes subiront ensuite une étape de maturation en fibres musculaires pour permettre la formation des fibres contractiles (fibres lentes et rapides) du muscle strié squelettique.

## **II Les microARNs (miARNs) impliqués au cours de la myogenèse**

Les facteurs protéiques myogéniques préalablement décrits, activent l'expression des miARNs qui, en retour les régulent. Ainsi les miARNs vont aussi avoir un rôle important au cours du développement du muscle strié squelettique (Deng, Poliakov et al. 2009; Wang, Zhang et al. 2010).

### **II.1 Rappels sur les miARNs**

Initialement découverts en 1993 chez *Caenorhabditis elegans*, les miARNs sont de petits ARN non-codants de 20-22 nucléotides de long environ, qui régulent négativement l'expression des gènes (protéines et/ou ARNm). Ils apportent un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation de l'expression génique de quasiment tous les processus cellulaires (prolifération, différenciation, métabolisme, apoptose...) (Ambros 2001; Ambros and Lee 2004; Bartel 2004; He and Hannon 2004; Russo and Giordano 2009). Actuellement, plus de 21200 miARNs (dont 1600



**Figure 27** Les différentes étapes de la biogenèse des microARNs  
d'après Davidson and McGray 2011

<chez l'homme) sont identifiés, séquencés et répertoriés dans la banque de données miRBase (<http://www.mirbase.org/>). La genèse des miARNs s'effectue en 4 étapes successives (Figure 27) :

#### (1) Transcription du premier précurseur, le pri-microARN

Les pri-microARNs peuvent être localisés dans les introns (la majorité), les exons des gènes, ou dans les séquences intergéniques (Rodriguez, Griffiths-Jones et al. 2004; Saini, Griffiths-Jones et al. 2007; Griffiths-Jones, Saini et al. 2008; Rogaev, Borinskaia et al. 2008). La majorité des pri-microARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II, qui permet la synthèse d'un précurseur de plusieurs milliers de nucléotides (primiR). Le primiR est caractérisé par une tige d'ARN double brin présentant des mésappariements, une boucle, et des fragments d'ARN simple brin (d'une quarantaine de nucléotides) de part et d'autre de cette structure tige-boucle. L'extrémité 5' possède une coiffe 7-méthylguanosine et l'extrémité 3', une queue polyA comme pour les ARN messagers (Cai, Hagedorn et al. 2004; Chen, Li et al. 2004; Lee, Kim et al. 2004). Ce précurseur va subir deux étapes de clivage successifs (Lee, Kim et al. 2004).

#### (2) Premier clivage : génération du second précurseur, le pré-microARN

Chez les vertébrés, le clivage du primiR est effectué dans le noyau par un complexe multiprotéique, le « microprocesseur », qui est composé des protéines Drosha (ribonucléase, RNase de type III) et DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) qui est une protéine de liaison à l'ARN double brin (Denli, Tops et al. 2004; Gregory, Yan et al. 2004; Han, Lee et al. 2004; Landthaler, Yalcin et al. 2004; Seitz and Zamore 2006). Le clivage génère un second précurseur en épingle à cheveu de 70 à 100 nucléotides de long, le pré-miARN (prémiR), dont les extrémités 3' sont sortantes (de 2 nucléotides) (Lee, Jeon et al. 2002; Lee, Ahn et al. 2003).

#### (3) export du prémiR dans le cytoplasme

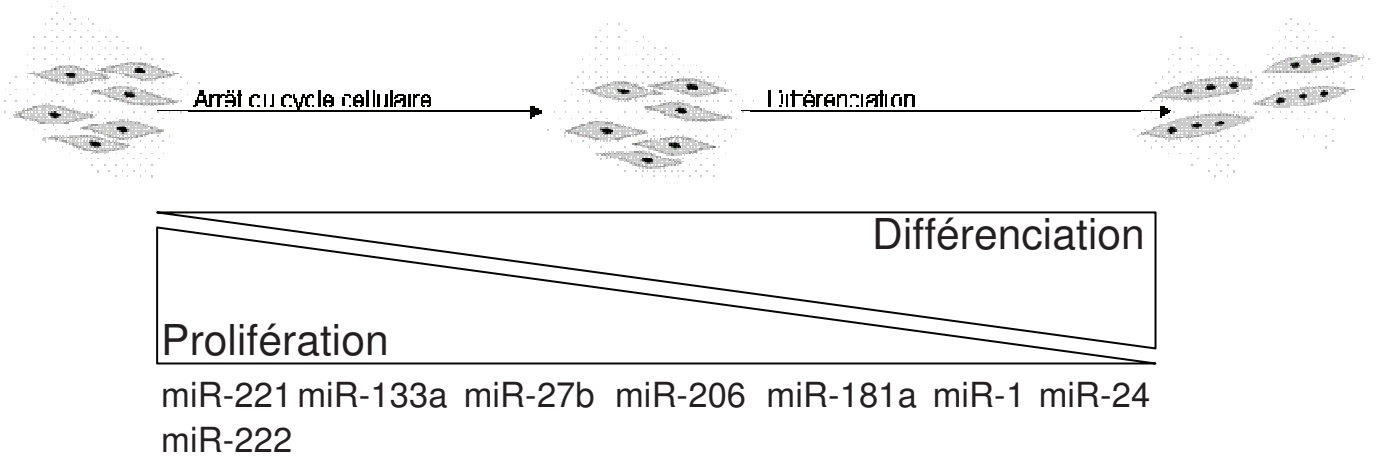
Le prémiR est exporté vers le cytoplasme par la protéine Exportine-5, afin de poursuivre sa maturation (Lund, Guttinger et al. 2004). L'exportine-5 (XPO5) est une protéine responsable du transport de protéines du noyau vers le cytoplasme à

travers les pores nucléaires, et reconnaît le pré-miR via son extrémité 3' sortante (Yi, Qin et al. 2003; Bohnsack, Czapinski et al. 2004; Lund, Guttinger et al. 2004). La fixation de l'exportine au pré-miR est dépendante de la GTPase Ran sous sa forme GTP (Yi, Qin et al. 2003; Zeng and Cullen 2004; Okada, Yamashita et al. 2009). L'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et la libération du pré-miARN.

#### (4) Second clivage et formation du complexe miRISC

Dans le cytoplasme, le pré-miR va être pris en charge par une seconde RNase de type III, l'enzyme DICER. Cette enzyme, en collaboration avec la protéine TRBP (TAR RNA binding protein), va permettre la genèse d'un duplex (ARN double brin) d'une vingtaine de nucléotides aux extrémités 3' sortantes (2 nucléotides de chaque côté) (Hutvagner, McLachlan et al. 2001). Un des deux brins du duplex correspond au miARN mature, et va être incorporé dans le complexe ribonucléoprotéique RISC (RNA-induced silencing complex). La plupart du temps, l'autre brin (miARN\*) est dégradé. Pour certains miARNs, le brin miARN\* peut lui aussi servir de miARN (Liu, Carmell et al. 2004; Meister, Landthaler et al. 2004; Stefani and Slack 2008). L'intégration du microARN simple brin mature dans le complexe ribonucléique RISC constitue ainsi le complexe miRISC. Ce complexe comporte le microARN mature, les protéines DICER, TBPP et les protéines de la famille Argonaute (AGO1 à 4). L'ensemble des protéines du complexe est essentiel au rôle fonctionnel des microARNs (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003; Valencia-Sanchez, Liu et al. 2006).

Les miARNs empêchent la traduction des ARN messenger en protéine selon deux mécanismes dépendants du degré de complémentarité de l'appariement du miARN à la région 3'UTR (untranslated region) de l'ARN messenger (Ambros and Lee 2004; Bartel 2004; He and Hannon 2004; Stefani and Slack 2008; Russo and Giordano 2009). Dans les cellules animales, le miARN reconnaît une séquence nucléotidique appelée région MRE (miRNA Response Element). Si la complémentarité de bases est parfaite (rare chez les vertébrés), le messenger est dégradé, sinon la traduction du messenger par toute la machinerie ribosomale est réprimée (Lee, Jeon et al. 2002; Ambros and Lee 2004; Bartel 2004; He and Hannon



**Figure 28 Expression différentielle des principaux miARNs au cours de la différenciation**  
*d'après Eisenberg et al. 2009, Güller and Russel 2010, Sayed and Abdellatif 2011*



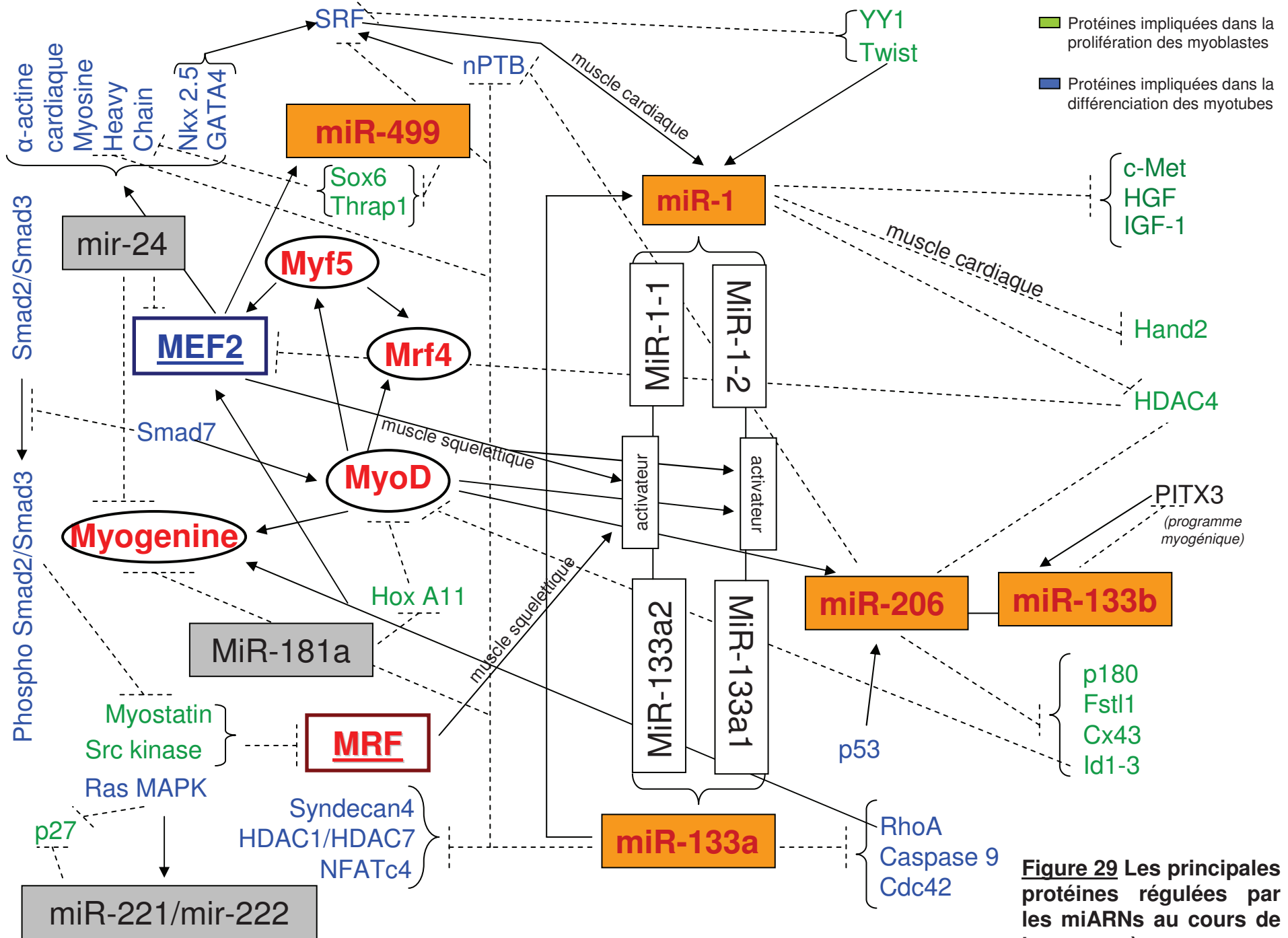
2004; Liu, Carmell et al. 2004; Meister, Landthaler et al. 2004; Yekta, Shih et al. 2004; Shin, Nam et al. 2010).

Les ARNm reconnus par les microARNs sont généralement accumulés dans des structures subcellulaires appelées P-bodies (Eulalio, Behm-Ansmant et al. 2007). Les P-bodies sont des structures intracellulaires dans lesquelles les ARNm non traduits seront dégradés par des enzymes ribonucléolytiques, ou temporairement mis à l'écart en vue d'un éventuel retour vers la traduction. Les GW-bodies constituent un autre compartiment de stockage des miARNs, qui se distinguent des P-bodies par la présence de la protéine GW182 (protéine de 182 kDa comportant de nombreux motifs répétés [Glycine (G) – Tryptophane (W)]) et par son interaction aux endosomes multivésiculaires (Gibbins, Ciaudo et al. 2009). Encore mal définis et décrits dans la littérature, ces deux compartiments intracellulaires sont fréquemment assimilés en une seule et même structure de stockage des miARNs (Ding, Spencer et al. 2005; Jakymiw, Lian et al. 2005; Liu, Rivas et al. 2005; Liu, Valencia-Sanchez et al. 2005; Pillai, Bhattacharyya et al. 2005; Rehwinkel, Behm-Ansmant et al. 2005; Sen and Blau 2005; Ding and Han 2007; Eulalio, Huntzinger et al. 2008).

## **II.2 Rôle des miARNs au cours de la myogenèse**

Parmi les miARNs impliqués, la majorité est spécifiquement exprimée par le muscle squelettique et a un rôle important au cours de la myogenèse : régulation de la prolifération et du processus de différenciation (Figures 28 et 29) (Hobert 2004; Callis, Chen et al. 2007). Ces microARNs sont renommés « myomiRs ». Les mieux caractérisés sont miR-1, miR-206, miR-133a et miR-133b (en rouge sur la Figure 29) (McCarthy 2008).

Dès l'initiation de la différenciation, les cellules musculaires expriment les myomiRs, miR-206, miR-1, et miR-133a, qui sont activés principalement par MyoD (Rao, Kumar et al. 2006; Sayed and Abdellatif 2011). L'expression des miARNs biscitroniques miR-1 et miR-133a augmente simultanément au fur et à mesure de la différenciation des cellules en myotubes (Chen, Mandel et al. 2006). MiR-1 est nécessaire et suffisant pour induire la différenciation des cellules en inhibant



**Figure 29** Les principales protéines régulées par les miARNs au cours de la myogenèse

l'expression d'inhibiteurs de la différenciation myogénique. Par exemple, miR-1 inhibe les enzymes histones déacétylases, HDAC, qui répriment les protéines de la famille MEF2 nécessaires à la différenciation myogénique. MiR-133 est exprimé en début de différenciation et réprime les protéines SRF (Serum Response Factors, SRF), impliqués dans la prolifération et la croissance du muscle squelettique (Chen, Mandel et al. 2006). MiR-206 favorise également la différenciation musculaire (Chen, Mandel et al. 2006; Koutsoulidou, Mastroiannopoulos et al. 2011). Les microARNs miR-208a, miR-208b et miR-499 sont également spécifiquement exprimés au cours de la myogenèse (différenciation et spécification du type de fibres) et lors de la régénération musculaire dans les cas de dommages tissulaires (Drummond, McCarthy et al. 2008; Eisenberg, Alexander et al. 2009; Williams, Liu et al. 2009). Outre ces miARNs spécifiques du muscle, d'autres miARNs ubiquitaires, sont essentiels à la myogenèse (miRNA-181, miRNA-24, miRNA-221, miRNA-222, MiRNA-214, miRNA-26a, miRNA-29 et miRNA-27b) (Naguibneva, Ameyar-Zazoua et al. 2006; Wong and Tellam 2008; Cardinali, Castellani et al. 2009; Crist, Montarras et al. 2009; Eisenberg, Alexander et al. 2009; Saccone and Puri 2010).

### **III Modèle d'étude de la myogenèse : le modèle murin C2C12**

L'étude des caractéristiques et des fonctions du muscle squelettique a été facilitée par l'établissement de lignées cellulaires capables de réaliser ce processus de différenciation myogénique.

Parmi celles-ci, la lignée cellulaire C2 a été établie à partir du tissu musculaire prélevé au niveau de la patte arrière de souris adultes C3H âgées de deux mois, ne présentant aucune anomalie musculaire (Yaffe 1968; Yaffe and Saxel 1977). Parmi les différents sous clones issus de la lignée parentale C2, le sous-clone C2C12 est le plus utilisé (Blau, Pavlath et al. 1985). Les myoblastes de la lignée C2C12 prolifèrent et demeurent indifférenciés aussi longtemps qu'ils sont maintenus à faible confluence. Les cellules C2C12 ont la capacité d'induire le processus de différenciation myogénique lorsqu'elles sont à forte densité cellulaire et en situation de privation et/ou de faible quantité de sérum dans le milieu de culture. Ressemblant

à des fibroblastes lorsqu'elles sont sous la forme de myoblastes, elles prennent un aspect tubulaire après leur différenciation en myotubes plurinucléés. Ces cellules expriment les différents marqueurs caractéristiques des fibres musculaires matures (myogénine, alpha-actinine sarcomérique, la myosine musculaire, la créatine kinase et le récepteur de l'acétylcholine...) (Blau, Pavlath et al. 1985).

Outre leur facilité d'utilisation, elles possèdent un profil de signalisations et de réponses transcriptionnelles proches des myoblastes des cultures primaires. Elles constituent un modèle de choix pour l'étude de la myogenèse, expliquant ainsi qu'elles soient largement utilisées *in vitro* pour acquérir de nouvelles données sur la différenciation musculaire (Cornelison 2008). D'autres lignées bien caractérisées sont aussi utilisées pour l'étude de la myogenèse. C'est le cas de la lignée de rat L6 qui dérive de myoblastes obtenus à partir de la patte postérieure de rats nouveau-nés (Yaffe and Saxel 1977). De la même façon, les cellules de cette lignée ont une forte capacité de différenciation dans des milieux de culture contenant peu de sérum.

# ARTICLE 1

## **C2C12 myoblast and myotube secreted specific exosome-like vesicles involved in myogenesis**

Alexis Forterre, Audrey Jalabert, Emmanuelle Berger, Mathieu Baudet, Karim Chikh, Elisabeth Errazuriz, Joffrey De Larichaudy, Michel Record, Alain Geloën, Etienne Lefai, André Tchernof, Hubert Vidal, Yoanne Couté and Sophie Rome

*Article en révision dans « Molecular and Cellular Proteomics »*

NB : La liste des protéines identifiées (Supplementary Table 1 et Supplementary Table 2) dans les exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes est disponible sur demande.

## **C2C12 myoblast and myotube secrete specific exosome-like vesicles involved in myogenesis**

Alexis Forterre<sup>(1)</sup>, Audrey Jalabert<sup>(1)</sup>, Emmanuelle Berger<sup>(1)\*</sup>, Mathieu Baudet<sup>(3, 6, 7)\*</sup>,  
Karim Chikh<sup>(1)</sup>, Elisabeth Errazuriz<sup>(2)</sup>, Joffrey De Larichaudy<sup>(1)</sup>, Michel Record<sup>(4)</sup>, Alain  
Geloën<sup>(1)</sup>, Etienne Lefai<sup>(1)</sup>, André Tchernof<sup>(5)</sup>, Hubert Vidal<sup>(1)</sup>, Yohann Couté<sup>(3, 6, 7)</sup>,  
and Sophie Rome<sup>(1)§</sup>

(1) Laboratory CarMen (INSERM 1060, INRA 1235, INSA), University of Lyon,  
Faculté de Médecine Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69600 Oullins, FRANCE

(2) Centre Commun d'Imagerie de Laënnec (CeCIL), SFR Santé Lyon-Est, University  
of Lyon, FRANCE

(3) CEA, IRTSV, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble,  
FRANCE

(4) INSERM-UMR 1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse  
(CRCT), Centre Claudius Regaud, 20-24 Rue du Pont Saint-Pierre, 31052 Toulouse  
Cedex

(5) Endocrinology and Genomics, Laval University Medical Research Center, Quebec  
City, Quebec, CANADA

(6) INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, FRANCE

(7) Joseph Fourier University, Grenoble 1, F-38000 Grenoble Cedex 09, FRANCE

§Corresponding author : Dr. Sophie Rome, srome@univ-lyon1.fr

\* These authors contributed equally to this work

*Running title* : muscle cell exosomes

*Key Words* : exosome, skeletal muscle, myogenesis, integrin, proteomic

## **SUMMARY**

Exosomes represent a discrete population of nanometer-sized microvesicles formed in multivesicular bodies (MVBs) during endosome maturation by inward budding of their limiting membrane. They are released from the cell into the microenvironment following fusion of MVBs with the plasma membrane. Recent data indicated that exosomes might convey information and signals between neighbouring cells but also between distant tissues. During the last decade, skeletal muscle secreted proteins have been shown to play important roles in intercellular communication. In order to determine if exosomes would participate to these molecular dialogs, we determined and compared the protein contents of the exosome-like vesicles (ELVs) released by the C2C12 murine cell line during proliferation and after differentiation. Using proteomic approach combined with electron microscopy, western-blot and bioinformatic analyses, we demonstrated that these vesicles displayed the classical properties of exosomes isolated from other cell types notably containing components of the ESCRT machinery and of the MVBs, as well as and numerous tetraspanins. Specific muscle proteins were also identified. In addition we found that ELVs protein content was modulated in relation with the C2C12 differentiation process. We demonstrated for the first time that these ELVs participated both in proliferation of myoblasts and in the first steps of differentiation into multinucleated myotubes, by regulating expression levels of Cyclin D1, myogenin and Smad3. Taken altogether, our data are consistent with an important role of secreted ELVs in skeletal muscle biology.

## INTRODUCTION

Skeletal muscle (SkM), the largest organ in the human body, is responsible for whole-body metabolism, energy homeostasis, locomotion and serves as a body protein pool. It is a highly adaptable tissue, responding to numerous environmental and physiological challenges by changing its phenotypic profile in terms of size as well as composition. During the last decade, SkM-secreted proteins have emerged as important players in intercellular communication (1-3). Among them, a large number of soluble peptide hormones and cytokines called myokines are capable of triggering homeostasis adaptations in other peripheral organs (e.g. ; pancreas, adipose tissue) (4) or are involved in the process of myogenesis (e.g. ; IL-4, IL-7 and IL-13) (5; 6). In addition, Nishizawa et al. (7) identified a novel skeletal muscle-derived secretory factor, Musclin, whose expression was tightly regulated by nutritional changes and by insulin. Bolton et al. (3) also described that SkM of obese type 2 diabetic *Psammomys obesus* differentially secreted the extracellular matrix protein Periostin. This protein was further correlated with the development of cardiovascular disease associated with human obesity (8). Finally, analysis of rat skeletal muscle secretome in response to insulin (9) or tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )-induced insulin resistance (4) led to the discovery of numerous secreted proteins. All these results opened an entire new field of research placing skeletal muscle as a secretory organ.

In addition to soluble proteins and mediators, it has recently been established that cells release membrane nanovesicles called exosomes which could also mediate intercellular cross-talks under normal and pathological conditions (10). Exosomes represent a discrete population of 30-100 nanometer-sized vesicles formed in the endocytic compartments, called multivesicular bodies (MVBs), during endosome maturation by inward budding of their limiting membrane (11). They are released



from the cell into the microenvironment following the fusion of MVBs with the plasma membrane. The membrane lipid composition of exosomes is similar to membrane lipid rafts, *i.e.* ; they are rich in cholesterol, sphingomyelin and ganglioside GM3, which confers resistance to triton detergent and sensitivity to saponin (12). Exosome secretion has first been reported for reticulocytes during their differentiation (13). It was then found that other hematopoietic cells (B lymphocytes, dendritic cells, T lymphocytes and mast cells) as well as non-hematopoietic cells (intestinal epithelial cells, neuroglial cells, adipocytes, myoblasts and insulinoma NIT-1 cells) also have the ability to release such nanovesicles (11). To date their biological functions remain largely unknown. It was suggested that they would be involved in the eradication of obsolete proteins (*e.g.* ; reticulocyte exosomes contain the transferrin receptor (13)) or could also play a role as modulators of the immune response (14), in the dissemination of viruses and prions, and in mediating communication between tumour cells and their microenvironment (15; 16). Recent data indicated that exosomes might also convey information and signals between neighbouring cells but also between distant tissues (17-20) by RNA, protein and lipid transfer (21). Indeed, the source of exosomes defines their function. For example antigen-presenting cell-derived exosomes induce whereas tumor-derived exosomes suppress immune response (22). Thus, the characterisation at the proteomic and genomic levels of exosomes released from SkM and the study of their biological functions would allow identifying new potential mediators between SkM and other tissues, or factors that can act as endocrine signals during myogenesis.

Recently, ELV were isolated from conditioned media of C2C12 myoblasts in proliferation (23). In addition, it was also found that skeletal muscle secretome was dynamically regulated during myoblast differentiation (1). Thus, we postulated that

muscle cells would release different populations of exosomes-like vesicles, during the myogenic process, and that their composition could likely change during myotube formation. To validate this hypothesis we decided to use a shotgun proteomic approach in order to determine the protein contents of the nanovesicles secreted from C2C12 myoblasts and myotubes. More than 400 different proteins were identified. Using extensive bibliographic and bioinformatic analysis we found that classical component of exosomes isolated from other cell type, such as components of the ESCRT machinery and of MVBs as well as numerous tetraspanins (10) were contained in these vesicles. In addition we found that their protein compositions differed in relation with the muscle cell differentiation process, revealing a tissue specific signature. Finally, we showed that these ELVs participated both in myoblast proliferation and in their differentiation into multinucleated myotubes.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **C2C12 culture conditions**

C2C12 mouse myoblasts were routinely maintained in DMEM 4.5g/l glucose supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), 1000 UI/ml penicillin, 1000 UI/ml streptomycin and 2 mM L-Glutamine at 37°C in humidified air containing 5% CO<sub>2</sub>. Differentiation was induced by the addition of differentiation medium (DMEM 4.5g/l glucose supplemented with 2% Horse Serum (HS)). To isolate exosomes from myoblast- and myotube-conditioned media for proteomic analysis and functional analysis, FBS and HS were previously centrifugated at 100,000g overnight at 4°C. The supernatant was passed through a 0.22 µm filter and diluted with sterile DMEM.

### **Isolation of myoblast- and myotube-secreted nanovesicles**

ELVs were purified from the C2C12 myoblast- and myotube-conditioned media as previously described (24). Briefly, cell debris and organelles were eliminated at 2,000g for 20min and at 10,000g for 30 min. The resulting supernatant was filtered through a 0.22 µm filter. ELV were pelleted by ultracentrifugation at 100,000g for 70min +4°C (Beckman-Coulter, Optima™ L-80-XP ultracentrifuge, type 50-2Ti rotor). The nanovesicle pellet was washed with 25ml of cold PBS in order to minimize sticking and trapping of non-ELV materials. Protein content of ELVs was quantified using Bradford protein assay.

### **Size distribution of the nanovesicles secreted by C2C12 cells**

The size distribution of ELVs secreted from C2C12 cells was measured by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer NanoS (Malvern Instruments, UK). An aliquot of extracted nanovesicles in PBS was analysed at 20°C. Refractive index and viscosity of dispersant were respectively of 1.332 and 1.029 cP at 20°C (25). Particle size distribution and corresponding mean hydrodynamic diameter were calculated by the software.

### **Transmission Electron Microscopy (EM)**

Nanovesicles in PBS were adsorbed on 200 Mesh nickel grids coated with formar-C. Immunogold labelling was performed by flotation of grids on drops of reactive media. Non-specific sites were coated with 1% BSA in 50 mM Tris` HCL, pH 7.4 for 10 min at RT. Antibody incubation was carried out 4 hours at 4°C in a wet chamber with mouse monoclonal antibody raised against CD63 (sc-15363) or TSG101 (sc-6037) antibodies (Santa Cruz Biotechnology) (dilution 1/50) in 1%BSA, 50 mM Tris` HCL, pH 7.4. Grids were successively washed once in 50mM Tris` HCL, pH 7.4 and pH 8.2 at RT. They were then preincubated with 1% BSA in 50 mM Tris` HCL, pH 8.2 for 10 min at RT and labelled with a goat anti mouse IgG gold-conjugated 10 nm, (Tebu bio, France) diluted 1/80 in 1% BSA- , 50mM Tris` HCL, pH 8.2 in a wet chamber for 45 min. Grids were successively washed once in 50 mM Tris` HCL, pH 8.2 and pH 7.4 and in filtrated distilled water at RT. Finally, grids with suspensions were colored with 2% phosphotunstic acid for 2 min and examined using a JEM Jeol 1400 transmission electron microscope (Tokyo, Japan) equipped with a Orius 600 camera (USA).

## **Western Blotting**

Proteins from Nanovesicles or from cellular lysates were migrated on SDS-PAGE gels (30  $\mu$ g). Following electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose PVDF membranes blocked at room temperature with 4% BSA in Tris-buffered saline/0.3% Tween20 and incubated overnight at 4 °C with gentle shaking with anti-CD63 (sc-15363), -CD81 (sc-166028), -Alix (sc-49268), -TSG101 (sc-6037), -TGFBR2 (sc-220), -Transgelin-2 (sc-51441) antibodies from Santa Cruz Biotechnology, and ITGB1 (04-1109) from Millipore, and anti-beta-actin (A5060) and -TSPAN 8 (SAB2102595) from SIGMA-ALDRICH, anti-Calnexin (S0998, Epitomics), total OxPhos (MS604, MitoSciences), and anti-ITGB5 (PAB11084, Tebu-Bio). The signal was detected by using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and revealed with the enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL).

## **Protein expression analysis by immunocytofluorescence**

Cells were fixed in 10% formaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Non-specific binding sites were blocked with 1% BSA in 1x PBS for 1 h at room temperature. Cells were then incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies (anti-Myogenin, F5D; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA). Detection was achieved by using Alexa 555-conjugated donkey anti-goat and goat anti-mouse IgG (Molecular Probes/Invitrogen). Cells were mounted with Vectashield with DAPI Fluoprep mounting medium (H1200; Vector Laboratories, Peterborough, England) and examined by fluorescence microscopy using an Axiovert 200 microscope, an AxioCam MRm camera, and Axiovision 4.1

image acquisition software. The number of Myogenin positive nuclei was calculated both manually or by using the software AutoMeasure from Zeiss Axiovision.

### **qRT-PCR**

Real-time RT-PCR was performed using ABsolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Abgene, Courtaboeuf, France) with a Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science, Paris, France). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Results were normalised with the gene encoding TBP used as the reference (26). Comparisons were analysed using Student's t test. Significance was defined as  $p$  value of  $<0.05$ . PCR primer sequences were CCND1 (cyclin D1) S-CTTCCTCTCCAAAATGCCAG, CCND1 AS-TGGAGGGTGGGTTGGAAATG, SMAD3 (SMAD family member 3) S-GGACGCAGGTTCTCCAAACC, SMAD3 AS-AAGTTCCACGGCTGCATTCC, MYOG S-CAACCCAGGAGATCATTTGC, MYOG (myogenin) AS-CATATCCTCCACCGTGATGC, TBP (TATA box binding protein) S-TTCACATCACAGCTCCCCAC, TBP AS-TGGTGTGCACAGGAGCCAAG.

### **Proteomic analyses of exosome-like vesicles secreted from C2C12 myoblasts and myotubes**

*SDS-PAGE*: exosome proteins resuspended in Laemmli buffer were stacked (2 mm) on SDS-PAGE gels (4-12% NuPAGE gels, Invitrogen) before being stained by Coomassie blue R-250 (Bio-Rad).

*Protein digestion*: Protein bands were manually excised from the gels and washed several times by incubation in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 15 min and then in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  containing 50% (v/v) acetonitrile for 15 min. Gel pieces were then dehydrated with 100 % acetonitrile, incubated with 7%  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 7% formic acid for 15

min before being washed with the destaining solutions described above. Modified trypsin (Promega, sequencing grade) diluted in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  was added to the dehydrated gel spots for an overnight incubation at 37°C. Peptides were then extracted from gel pieces in three sequential extraction steps of 15 min in 30 $\mu\text{L}$  of 50% acetonitrile, 30 $\mu\text{L}$  of 5% formic acid and finally 30 $\mu\text{L}$  of 100% acetonitrile. The pooled supernatants were then dried under vacuum.

*Nano-LC-MS/MS analyses:* The dried extracted peptides were resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analysed by online nanoLC-MS/MS (Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fischer Scientific). Peptides were sampled on a 300  $\mu\text{m}$  x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm C18 column (Gemini C18, Phenomenex). The nanoLC method consisted in a 120-minutes gradient ranging from 5% to 40% acetonitrile in 0.1% formic acid at a flow rate of 300nL/min. MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fischer Scientific). Spray voltage and heated capillary were respectively set at 1.4 kV and 200°C. Survey full-scan MS spectra ( $m/z = 450\text{--}1600$ ) were acquired in the Orbitrap with a resolution of 60,000 after accumulation of  $10^6$  ions (maximum filling time: 500 ms). The five most intense ions from the preview survey scan delivered by the Orbitrap were fragmented by collision induced dissociation (collision energy 35%) in the LTQ after accumulation of  $10^4$  ions (maximum filling time: 100 ms).

*Peptide and protein identifications:* RAW files were processed using MaxQuant (27) version 1.3.0.3. Spectra were searched against the Uniprot database (Mus musculus taxonomy 10090, 86644 sequences, Bos taurus taxonomy 9913, 34280 sequences and Equus caballus taxonomy 9796, 24299 sequences; August 2012 versions) and the frequently observed contaminants database embedded in MaxQuant. Trypsin

was chosen as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Precursor mass error tolerances were set respectively at 20 ppm and 6 ppm for first and main searches. Fragment mass error tolerance was set to 0.5 Da. Peptide modifications allowed during the search were: trioxidation (C, fixed), acetyl (N-ter, variable), dioxidation (M, variable), oxidation (M, variable) and deamidation (NQ, variable). Minimum peptide length was set to 7 amino acids. Minimum number of peptides, razor + uniques peptides and unique peptides were set respectively to 2, 2 and 1. Maximum false discovery rates - calculated by employing a reverse database strategy - were set to 0.01 at peptide and protein levels. Raw MS data files, unfiltered protein groups and peptides tables have been uploaded in ProteomeXchange server ([www.proteomexchange.org](http://www.proteomexchange.org), accession PXD000022). Proteins identified as `contaminants`, `reverse` and `only identified by site` were discarded from the list of identified proteins. Proteins identified in the bovine and/or horse databases but not in the mouse one were also deleted. Finally, only proteins identified in 2 biological replicates with a minimum of 2 MS/MS counts in 1 biological replicate were considered as member of exosomes from myoblasts and/or myotubes.

### **Impedance measurement with the xCELLigence RTCA DP Instrument (Roche)**

In order to monitor the effect of C2C12 ELVs on the proliferative capacities of C2C12 myoblasts, we used the xCELLigence live cell analysis System (Roche Applied Science) which offers dynamic live cell monitoring (28). The System measures electrical impedance across interdigitated micro-electrodes integrated on the bottom of tissue culture E-Plates. Background of the E-plates was determined in 50  $\mu$ l medium and subsequently 150  $\mu$ l of the C2C12 cell suspension was added at optimal seeding number (2500 cells/cm<sup>2</sup>). E-plates were placed into the Real-Time Cell



Analyzer (RTCA) station. One day after plating, cells were grown in DMEM 4.5g/l glucose supplemented with 5 or 10% exosome-depleted FBS, and incubated with various concentrations of conditioned medium from myotubes and myoblasts or ELVs collected from myoblasts and myotubes and monitored again every 30 min for 22 h. The impedance measurement provides quantitative information about the biological status of the cells, including cell number, viability, and morphology. Impedance was represented by the cell index (CI) values  $((Z_i - Z_0) / 15[\text{Ohm}])$ ;  $Z_0$ : background resistance,  $Z_i$ : individual time point resistance) and the normalized cell index was calculated as the cell index  $CI_{t_i}$  at a given time point divided by the cell index  $CI_{\text{nml-time}}$  at the normalization time point (nml\_time). At the end of the experiment, cells were trypsinized, counted and their size was determined by using the Scepter 2.0 handheld automated cell counter from Millipore.

## RESULTS

As exosomes are present in all serums used for cell culture, it was thus necessary to remove the exosomal fraction from fetal bovine and horse serums to avoid contaminations of C2C12 myoblast- and myotube-conditioned media. We first verified that these new serum compositions did not affect the cell growth. As shown in Supplementary Figure 1, growth for 48H in 10% fetal bovine exosome-depleted serum neither affected proliferation nor C2C12 myoblast cell sizes. C2C12 myotube formation was also not affected when cells were incubated in 2% horse exosome-depleted serum compared with normal serum (Supplementary Figure 2).

### **C2C12 myoblasts and myotubes secreted nanovesicles with exosome-like properties**

Electron microscopy and dynamic light scattering analyses were performed on the nanovesicle pellets obtained after ultracentrifugation of C2C12 conditioned media. Figure 1 showed that the size distribution of the nanovesicles displayed a bell-shaped curve suggesting a homogeneous population, with a mean size 110-120 nm in agreement with the reported size of exosomes (25; 29; 30). These nanovesicles also expressed exosomal proteins at their membrane surface such as CD63 and TSG101 (Figure 1). Western-blot analysis on the nanovesicle pellet showed a strong enrichment of classical exosomal proteins as well as a clear impoverishment in proteins from other cell compartments compared with the parent cells (Figure 1).

Proteomic analysis were performed on 3 independent preparations of ELVs, each resulting from the ultracentrifugation of 200ml of conditioned media, filtered through a 0.22  $\mu$ m filter, from either 60-70% confluent C2C12 myoblasts or fully

differentiated C2C12 myotubes. We constantly found that C2C12 MB secreted 0.06 $\mu$ g ELV-MB/24h/ml and fully differentiated C2C12 MT secreted 0.3  $\mu$ g ELV-MT/24h/ml. Both ELV preparations were solubilized in SDS-PAGE sample buffer and stacked on SDS-PAGE gels. Gel bands were excised, contained proteins submitted to trypsin digestion and extracted peptides subjected to nanoLC-MS/MS analysis. Only proteins identified using MaxQuant (27) in 2 biological replicates and with at least 2 MS/MS counts in 1 of them were considered as present in ELVs from myoblasts and/or myotubes. Protein database searching of MS/MS data resulted in the identification of 449 unique proteins in ELVs. Among them, 318 and 375 were found in ELVs released from myoblast (ELV-MB) and myotubes (ELV-MT), respectively. Among the 163 proteins previously identified in ELVs released from C2C12 myoblasts, by using a similar proteomic analysis (23), 88 were also included in the list of 318 proteins from myoblast ELVs. Consistent with the proposed late endosomal origin of exosomes, several identified proteins were associated with multivesicular body biogenesis (Supplementary Table 1 and Table 2). In addition these secreted nanovesicles contained the 25 proteins that are often identified in exosomes from various origin (31).

A consequent part of the proteins identified in ELV-MB and ELV-MT were involved in signalling pathways (n=58 and 71, respectively) (Supplementary Table 1 and Table 2). Some had been previously identified in C2C12 ELV-MB, like 14-3-3 proteins epsilon, theta and, zeta, Guanine nucleotide-binding protein beta 2, Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 and beta-2, Guanine nucleotide-binding G(0) subunit alpha1, GTPase Ran and Ras-related protein Rab-7a (23). In order to have a functional overview of ELV-MB and ELV-MT proteins, we used the integrative platform Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) (32) to

determine significant over-representation of Gene Ontology (G.O.) functional annotations by single enrichment analysis. We first analyzed the 244 proteins commonly identified in ELV-MB and ELV-MT. When considering an adjusted  $p$ -value  $< 0.01$ , 35 significant G.O. terms were found (Figure 2). Significant G.O. terms for 'biological processes' contained proteins involved in endocytosis and intracellular transport and localisation, cell adhesion, small GTPase mediated signal transduction, protein folding and cytoskeleton organization. Significant G.O. terms for 'molecular functions' were GTPase activity, phospholipid binding and calcium ion binding, pyrophosphatase and hydrolase activity and cytoskeleton binding. The proteins included in the top 10 significant G.O. terms for 'cellular components' were located in vesicles, early and late endosomes and sarcolemma, and cytoskeleton.

Taken all together, all these results supported the conclusion that the nanovesicles secreted in the extracellular medium of C2C12 cells consisted largely of exosomes.

In order to determine whether ELVs from C2C12 expressed particular protein subsets compared to the whole C2C12 secretome, we compared the lists of 318 and 375 proteins of ELV-MB and ELV-MT, respectively, with the one of 635 proteins identified in C2C12 myoblast secretome (1). Respectively, 72 and 91 proteins among the 635 secreted proteins were also identified in ELV-MB and ELV-MT. The weak overlapping between the datasets, supported the hypothesis that C2C12 ELV proteins identified in this study were mainly contained, or at least strongly enriched, in the nanovesicles collected from C2C12 conditioned media. Functional enrichment analysis by comparing the set of 635 secreted proteins from myoblasts with the set of 318 proteins from ELV-MB, revealed significant enrichment in 'protein binding' (GO :0016020,  $p=4.04^{-30}$ ), 'intracellular part' (GO :0044424,  $p=2.065^{-46}$ ) and

'transport' (GO :0006810,  $p=1.186^{-27}$ ) in the list of ELV-MB proteins. In addition, none of the GO categories previously found as significantly enriched in proteins from ELV-MT and ELV-MB (Figure 2) was found in the set of 635 secreted proteins (1). By contrast, the 635 secreted proteins were significantly enriched in genes coding for 'cytokines' when compared with the set of 318 ELV-MB (KEGG pathway mmu05322,  $p=0.004411$ ). These data suggested that skeletal muscle probably uses distinct pathways of secretion for distinct protein subsets.

### **Myoblasts and myotubes C2C12 secreted specific ELVs with distinct protein composition**

Previous proteomic analyses and microarray-based studies have identified differential waves of expressions of proteins and mRNAs across the early, mid, and late stages of C2C12 differentiation, suggesting their roles in myogenesis (33; 34). In this study, we also detected differential expression of, respectively, 25 and 71 proteins in ELV-MB and ELV-MT, indicating that during myogenesis, ELV protein content was also regulated (Supplementary Table 3, Figure 3). Among these proteins, 2 proteins previously identified only in the proteome of differentiated myotubes (33) were also detected only in ELV-MT (*i.e.* ; SGCA, DAG1). In addition, we identified 23 muscle-specific proteins (*i.e.* ; ACTC1, ATP2A1, ATP2A2, CAMK2G, CAPZB, CASQ1, CASQ2, CRYAB, DAG1, DES, FLNC, ITGB1, NES, RHOA, SGCA, SGCD, SNTB1, SNTB2, TLN1, TTN, UTRN, VCL and VIM) ([http://wiki.geneontology.org/index.php/Muscle\\_Biology](http://wiki.geneontology.org/index.php/Muscle_Biology)), confirming that exosome composition partially reflects the cellular origin. Bioinformatic analyses revealed that the 71 ELV-MT specific proteins were significantly enriched in genes involved in muscle contraction (GO :0006936) and metal ion transmembrane transporter activity

(GO :0046873) when compared to the group of 244 common proteins, between ELV-MB and ELV-MT. No significant biological functions were found in the group of 25 specific ELV-MB proteins.

Because previous studies had implicated integrins and tetraspanin as important players during myogenesis (*e.g.* ; cell proliferation, cell fusion, cell adhesion) but also for exosome uptake (35; 36), we analysed more in details the expressions of these proteins in C2C12 ELVs during myogenesis. Analysis of protein-protein interactions with the software STRING 9.0 (<http://string-db.org>) (37) indicated that during myogenesis, complexes of integrins and tetraspanins sorted into C2C12 ELVs changed (Figure 3, Figure 4). This reorganization during myogenesis might account for ELVs biological action (*i.e.* ; target cell selection and the tight interaction/uptake of exosomes by the target cell (35; 36)).

### **C2C12 ELV-MB are involved in myoblast proliferation**

The effects exerted by the conditioned media (CM) on the development of muscle cells have been documented a long time ago, demonstrating that myogenic cells modify their own extracellular media by secreting factors that exert autocrine and paracrine effects on the differentiation process (38). Because ELV-MT and ELV-MB displayed specific protein compositions we postulated that they would have different roles in the process of myogenesis. To investigate this, CM from C2C12 myoblasts and myotubes were collected and fractioned in order to determine the specific contribution of ELVs, in the whole C2C12 secretome (Supplementary figure 3). One day after seeding 200 $\mu$ L of the cell suspensions into E-plate 96, C2C12 myoblasts were treated with these different media and monitored every 15 minutes for 24 hours.

The cell growth curves were automatically recorded on the xCELLigence System in real time and the cell doubling time was calculated. As shown on Figure 5A, in normal growth medium (DMEM or DMEM depleted of its exosomes) the cell doubling time was 15h. We used this time as reference to calculate the doubling time of the cells incubated with the different conditioned media or ELVs. As presented on Figures 5B and 5C, myoblast conditioned medium (CM-MB) and myotube conditioned medium (CM-MT) both induced a decrease of cell growth as shown by an increase of the cell doubling time. As indicated on Figure 5B, removal of ELVs from CM-MB further reduced myoblast cell growth, as indicated by a significant increase of cell index doubling time ( $p < 0.01$ , CM-MB vs EDCM-MB). On the contrary, removal of ELVs from CM-MT had no significant effect on myoblast growth (Figure 5C). These results suggested that ELV-MB might participate in the regulation of C2C12 myoblast proliferation.

In order to analyse in more details the specific effects of ELV-MB and ELV-MT on C2C12 myoblast proliferation, myoblasts were grown with DMEM depleted-exosomes complemented with either ELV-MB or ELV-MT. Figure 6A shows that changes in the cell index doubling time depended on the origin of C2C12 ELVs. ELV-MT had an anti- myoblast cell proliferation effect, as determined by a significant increase of doubling time. ELV-MB had no effect compared with control medium. All these effects on proliferation were neither associated with modifications of cell morphologies, as determined by light-microscopy (data not shown), nor of mean cell sizes, as calculated with the Scepter 2.0 cell counter (Figure 6B).

In an attempt to unravel the mechanisms underlying the cell growth effect of ELV-MB, we quantified the expression of Cylin D1 gene (CNND1) involved in the regulation of cell-cycle (39). Figure 7 shows that ELV-MB removal from myoblast-CM

was associated with a reduced expression of Cyclin D1. This reduced gene expression was not detected when ELV-MT were removed from myotube-CM. Myoblasts incubated with ELV-MT displayed lower level of Cyclin D1 mRNA when compared with cells incubated with ELV-MB (Figure 7). Taken together, these results indicate that ELV-MB and ELV-MT have antagonist effects on myoblast proliferation.

In order to confirm that these data were not cell line-dependent or associated with the C2C12 cell growth conditions, we performed the same experiments as described in supplementary figure 3 with cultured rat L6 muscle cells, and with C2C12 myoblast differentiated with 1% Fetal Bovine Serum (FBS) instead of Horse Serum (HS). As indicated on supplementary Figure 4, removal of ELV-MB from myoblast conditioned medium always induced a decrease of Cyclin D1 mRNA level confirming the important role of ELV-MB on myoblasts proliferation.

### **C2C12 ELV-MT are involved in myoblast differentiation**

In many cell lineages, arrest of proliferation induces differentiation or apoptosis. In the case of muscle cells, it is well-known that cell cycle exit and differentiation are coupled during myogenesis (40). Expression of myogenin is considered one of the earliest molecular markers for cells committed to differentiation *in vitro* and is a prerequisite for efficient myofibers formation and muscle gene expression. Because incubation of C2C12 myoblasts with ELV-MT during proliferation induced cell growth arrest we postulated that ELV-MT would also be involved in the commitment of myoblasts in the process of differentiation. Thus, C212 myoblasts were grown in the presence of ELV-MB and ELV-MT until confluence and the myogenin mRNA level was quantified 24 hours after incubation in differentiation medium. As shown on Figure 8A, myogenin expression was significantly higher in cells incubated with ELV-



MT during proliferation compared with those grown with ELV-MB. We also analysed myogenin expression at the protein level by counting the number of myoblast nuclei expressing myogenin. As shown on Figure 8B, the percentage of positive nuclei for myogenin was significantly higher in cells incubated with ELV-MT during proliferation, compared with those incubated with ELV-MB. To confirm these results, we measured the expression of Smad3, recently described as an important player in the induction of cell growth arrest during myoblast differentiation (41). We found that Smad3 mRNA level was also significantly and specifically increased in myoblasts incubated with ELV-MT, confirming early entrance of the cells into the process of differentiation. These findings were confirmed on rat L6 muscle cells, and C2C12 myoblasts differentiated with 1% Fetal Bovine Serum (FBS) instead of Horse Serum (HS) (Supplementary Figure 5). Taken together, these results indicated that ELV-MT were involved in induction of early markers of differentiation.

## DISCUSSION

It is well-admitted that skeletal muscle (SkM) is an endocrine organ which by secretion of hormone-like factors may influence metabolism in tissues and organs. Until now, myokines from the muscle cell secretome provided a conceptual basis to explain how muscles communicate to other organs (4). In this study, we demonstrated for the first time that SkM secreted nanovesicles with exosome properties (ELVs) which are involved in the process of myogenesis. Moreover, we provided a useful database of proteins from ELVs released by the C2C12 murine cell line throughout myogenic proliferation and differentiation.

Discovered nearly 30 years ago, the earliest role proposed for exosomes was to shed unwanted proteins from cells undergoing terminal differentiation (42). Although this perspective may apply in certain situations like within the nervous system (43), the protein composition of exosomes seems more consistent with a positive role in communication with other cells (18; 29; 44; 45). In this work, we found that C2C12 ELVs expressed specific cell-adhesion molecules on their surfaces (*e.g.* ; ITGB1, NCAM, CD9, CD81, CD44, Myoferlin) which are known to be involved in the recognition and adhesion of competent myoblasts during the process of myoblast fusion (46-50). Because some of them are regulated during myogenesis (*i.e.* ; ITGB1, ITGB5 and TSPAN8), it is likely that they may facilitate ELVs uptake by myoblast. Indeed it was demonstrated that exosomes have the potential to selectively interact with specific target cells (51; 52), as recently demonstrated for the metastasis-promoting tetraspanin Tspan8 in cancer cells (36; 53).

Interestingly, the majority of the proteins identified in this study (*i.e.* ; 316) were both found in ELV-MB and ELV-MT preparations indicating that although during differentiation the organization of the cellular organelles and the plasma membrane of myoblasts changed dramatically with the consequent formation of a single functional unit, C2C12 ELVs composition remained quite constant. This result further supported the concept that sorting of proteins into C2C12 ELVs appears to be selective.

In parallel to the concept of cell-cell communication, it has been postulated that cells might export specific proteins into exosomes, such as proteins involved in specific signalling pathways, in order to reduce their intracellular concentrations (54). Indeed, Chairoungdua *et al.* (54) found that CD9 and CD82 boosted the release of exosomes containing  $\beta$ -catenin, thereby reducing cellular levels of the protein and inhibiting the Wnt pathway. Cells lacking CD9, on the other hand, produced fewer exosomes and showed higher Wnt signalling activity. With the C2C12 cells, we found that 20% of ELV proteins were involved in signalling pathways. They mainly belong to the G-protein family involved in many cellular processes, including signal transduction, protein transport, growth regulation and polypeptide chain elongation, vesicle formation, transport and fusion with the target membrane (55). In addition, previous data demonstrated their roles in myogenesis through the regulation of the expression of muscle-specific genes (56). As it has been found that exosome G-protein were functionally active (57), their strong enrichment in ELV-MB and -MT suggests that they could play an important role in the process of C2C12 differentiation.

Our results supported a model in which ELV-MB and ELV-MT may generate endocrine signals with specific roles during myogenesis. Indeed we demonstrated

that ELV-MB stimulated myoblast proliferation. On the other hand, we found that ELV-MT induced myoblast growth arrest and committed cells to differentiate. Interestingly, some effects of exosomes on cell proliferation have been previously reported for other cell types. For example, dendritic cell-derived exosomes triggered proliferation of natural killer cells (58) whereas exosomes released from cells of the thymus suppressed the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells (59). Exosomes derived from cancer cell lines were shown to increase proliferation of the releasing cells (60). Our data extended these observations by suggesting that this effect would be part of the normal process of myogenesis likely to coordinate myoblast cells during the differentiation step.

Among the 449 proteins identified in ELVs, 25 and 71 were found to be specific of, respectively, ELV-MB and ELV-MT. It is then tempting to imagine that the distinct composition of these secreted nanovesicles may sustain their divergent biological effects. In addition, part of the biological actions of ELV-MT and ELV-MB might come from their specific mRNA and microRNA contents. Indeed, Montecalvo and colleagues demonstrate that dendritic cells (DCs) secrete exosomes that are loaded with distinct sets of microRNA, dependent on the status of DC activation (61). Moreover, they provide proof of principle that, after being transferred by exosomes, microRNA can repress mRNAs in target cells (61). In addition, transfer of specific mRNA between exosomes and the target cells have been described (18; 20). Finally, Müller et al (2011) demonstrated that some GPI-anchored proteins which are embedded in the membranes of exosomes were also involved in the biological actions of the adipocyte-secreted exosomes (62).

Although a direct physiological role for muscle exosome-like vesicles has yet to be demonstrated, our data indicate that they represent important factors involved in

myogenesis, which participate in the dialog between myoblast and myotube, probably in combination with myokines (5). From a patho-physiological point of view, used as a molecular signal that accelerates myogenesis, muscle ELV treatment could be useful to ameliorate muscle diseases or to facilitate recovery from muscle atrophy and/or injury. Additional studies are now required to further determine the exact role of ELVs from skeletal muscle cells in tissue morphogenesis and in intercellular communication occurring in complex pathologies like type 2 diabetes. Moreover, complementary experiments should address the question of the underlying mechanisms of protein sorting into ELVs, and the inter-relationships between these sorted proteins remain to be explored in different patho-physiological conditions.

## REFERENCES

1. Henningsen J, Rigbolt KT, Blagoev B, Pedersen BK, Kratchmarova I. (2010) Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Mol Cell Proteomics* 9, 2482-96
2. Bortoluzzi S, Scannapieco P, Cestaro A, Danieli GA, Schiaffino S. (2006) Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome. *Proteins* 62, 776-92
3. Bolton K, Segal D, McMillan J, Sanigorski A, Collier G, Walder K. (2009) Identification of secreted proteins associated with obesity and type 2 diabetes in *Psammomys obesus*. *Int J Obes (Lond)* 33, 1153-65
4. Bouzakri K, Plomgaard P, Berney T, Donath MY, Pedersen BK, Halban PA. (2011) Bimodal effect on pancreatic beta-cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 60, 1111-21
5. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. (2003) IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113, 483-94
6. Haugen F, Norheim F, Lian H, Wensaas AJ, Dueland S, Berg O, Funderud A, Skalhegg BS, Raastad T, Drevon CA. (2010) IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C807-16
7. Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, Shimomura I. (2004) Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem* 279, 19391-5
8. Hindle AK, Edwards C, McCaffrey T, Fu S, Brody F. (2010) Identification of cardiovascular genes in omentum from morbidly obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 34, 1020-7
9. Yoon JH, Yea K, Kim J, Choi YS, Park S, Lee H, Lee CS, Suh PG, Ryu SH. (2009) Comparative proteomic analysis of the insulin-induced L6 myotube secretome. *Proteomics* 9, 51-60
10. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73, 1907-20
11. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. (2006) Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 140, 13-21
12. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244-7
13. Ahn J, Johnstone RM. (1993) Origin of a soluble truncated transferrin receptor. *Blood* 81, 2442-51
14. Kim SH, Bianco NR, Shufesky WJ, Morelli AE, Robbins PD. (2007) Effective treatment of inflammatory disease models with exosomes derived from dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J Immunol* 179, 2242-9
15. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery 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, 297-303
16. Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, Bobrie A, Jancic C, Boissonnas A, Delcayre A, Le Pecq JB, Combadiere B, Amigorena S, Thery C. (2008) Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res* 68, 1228-35
17. Deng ZB, Poliakov A, Hardy RW, Clements R, Liu C, Liu Y, Wang J, Xiang X, Zhang S, Zhuang X, Shah SV, Sun D, Michalek S, Grizzle WE, Garvey T, Mobley J,

- Zhang HG. (2009) Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes* 58, 2498-505
18. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654-9
19. Skog J, Wurdinger 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, 1470-6
20. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, de Paz N, Dooner MS, Puente N, Ayala C, Brilliant K, Berz D, Lee D, Ramratnam B, McMillan PN, Hixson DC, Josic D, Quesenberry PJ. (2010) Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol* 38, 233-45
21. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, De Medina P, Monsarrat B, Perret B, Silvente-Poirot S, Poirot M, Record M. (2010) Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 51, 2105-20
22. Schorey JS, Bhatnagar S. (2008) Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 9, 871-81
23. Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Gioacchini AM, Tibollo P, Battistelli M, Falcieri E, Battistin L, Agnati LF, Stocchi V. (2010) C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res* 316, 1977-84
24. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3, Unit 3 22
25. Gibbings 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, 1143-9
26. Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Hormann K, Kinscherf R, Goessler UR. (2009) Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC Mol Biol* 10, 66
27. Cox J, Mann M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-72
28. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. (2011) The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 740, 33-43
29. 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, 7309-18
30. Atay S, Gercel-Taylor C, Kesimer M, Taylor DD. (2011) Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Exp Cell Res* 317, 1192-202
31. Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. (2012) ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res* 40, D1241-4
32. Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A, Tarraga J, Pascual-Montano A, Nogales-Cadenas R, Santoyo J, Garcia F, Marba M, Montaner D, Dopazo J. (2010) Babelomics: an integrative platform for the analysis of

- transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 38, W210-3
33. Kislinger T, Gramolini AO, Pan Y, Rahman K, MacLennan DH, Emili A. (2005) Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation. *Mol Cell Proteomics* 4, 887-901
  34. Tannu NS, Rao VK, Chaudhary RM, Giorgianni F, Saeed AE, Gao Y, Raghov R. (2004) Comparative proteomes of the proliferating C(2)C(12) myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program. *Mol Cell Proteomics* 3, 1065-82
  35. Rana S, Zoller M. (2011) Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. *Biochem Soc Trans* 39, 559-62
  36. Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M. (2012) Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1574-84
  37. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguetz P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 39, D561-8
  38. Bischoff R. (1990) Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *J Cell Biol* 111, 201-7
  39. Sherr CJ. (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 20, 187-90
  40. Nadal-Ginard B. (1978) Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* 15, 855-64
  41. Ge X, McFarlane C, Vajjala A, Lokireddy S, Ng ZH, Tan CK, Tan NS, Wahli W, Sharma M, Kambadur R. (2011) Smad3 signaling is required for satellite cell function and myogenic differentiation of myoblasts. *Cell Res* 21, 1591-604
  42. 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, 27-36
  43. Smalheiser NR. (2007) Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol Direct* 2, 35
  44. Camussi G, Derigibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. (2010) Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 78, 838-48
  45. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius 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, 10963-72
  46. Charlton CA, Mohler WA, Blau HM. (2000) Neural cell adhesion molecule (NCAM) and myoblast fusion. *Dev Biol* 221, 112-9
  47. Grabowska I, Szeliga A, Moraczewski J, Czaplicka I, Brzoska E. (2011) Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression. *Cell Biol Int* 35, 125-33
  48. Mylona E, Jones KA, Mills ST, Pavlath GK. (2006) CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J Cell Physiol* 209, 314-21
  49. Tachibana I, Hemler ME. (1999) Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol* 146, 893-904



50. Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg UT, Schittny J, Muller U. (2003) Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell* 4, 673-85
51. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-79
52. Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M. (2012) Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol*,
53. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zoller M. (2011) Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 70, 1668-78
54. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. (2012) Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 190, 1079-91
55. Sasaki T, Takai Y. (1998) The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 641-5
56. Takano H, Komuro I, Oka T, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y. (1998) The Rho family G proteins play a critical role in muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 1580-9
57. Estelles A, Sperinde J, Roulon T, Aguilar B, Bonner C, LePecq JB, Delcayre A. (2007) Exosome nanovesicles displaying G protein-coupled receptors for drug discovery. *Int J Nanomedicine* 2, 751-60
58. Viaud S, Terme M, Flament C, Taieb J, Andre F, Novault S, Escudier B, Robert C, Caillat-Zucman S, Tursz T, Zitvogel L, Chaput N. (2009) Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha. *PLoS One* 4, e4942
59. Wang GJ, Liu Y, Qin A, Shah SV, Deng ZB, Xiang X, Cheng Z, Liu C, Wang J, Zhang L, Grizzle WE, Zhang HG. (2008) Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *J Immunol* 181, 5242-8
60. 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* 41, 875-80
61. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE. (2012) Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756-66
62. Muller G, Schneider M, Biemer-Daub G, Wied S. (2011) Upregulation of lipid synthesis in small rat adipocytes by microvesicle-associated CD73 from large adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1531-44

**FOOTNOTES**

This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Association Française de recherche sur les Myopathies (AFM), Association Française de Diabétologie (SDF/Rochediagnostics France) and INRA specific grant (ANSSD). We thank Cécile Vors and Marie-Caroline Michalski for their help during ELV size analysis. We are grateful to Michele Guescini from Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo (Italy), for providing us with the list of 163 proteins identified in her study (23)

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of nanovesicles isolated from C2C12 myoblast- and myotube-conditioned medium. A\_ Transmission electron microscopic images of purified secreted nanovesicles from myoblasts (MB) or myotubes (MT). Bar=100nm. These particles were labelled either with anti-CD63 or anti-TSG101 (*tumour susceptibility gene-101*) gold particles to determine whether they expressed these 2 exosomal proteins at their membranes. B\_ Sizes of the nanovesicles secreted by ELV-MB and ELV-MT as determined by granulometry. C\_ Analysis of the quality of the purified exosome-like vesicles by Western-blot. Equal protein amounts of extracts prepared from cells or exosomes were subjected to western blot analysis. The multivesicular body markers TSG101 and Alix (*ALG2-interacting protein 1*), and the tetraspanin CD81, were strongly enriched in exosome preparations compared with cell lysates.

Figure 2: Functional analysis of ELV-MB and ELV-MT 244 common proteins by using Babelomics 4.0. Only significant Gene Ontology terms are indicated

Figure 3: Western-blot analysis of proteins found differentially expressed between ELV-MB and ELV-MT (see Supplementary Table 3). ITG5 (*Itgb5*) : Integrin beta-5 ; TGFBR2 (*Tgfbr2*) : Transforming growth factor, beta receptor II ; TAGLN2 (*Tagln2*) : Transgelin-2 ; TSPAN8 (*Tspan8*) : Tetraspanin-8.

Figure 4: Network views summarizing protein-protein associations of integrin and tetraspanin into ELV-MB and ELV-MT, determined with STRING 9.0 (37) (medium confidence). STRING uses a spring model to generate the network images. Nodes

are modelled as masses and edges as springs; the final position of the nodes in the image is computed by minimizing the 'energy' of the system. a blue line - cocurrence evidence; a light blue line - database evidence. The network nodes are proteins. Colours of the proteins depend on their position on the graph.

Figure 5 : Real time impedance measurement of proliferating C2C12 myoblasts (xCelligence System, Roche Applied Science). (A)\_Myoblasts (n=8) were incubated either with conditioned medium (CM) or with DMEM 5% Exosome-Depleted serum (DED) in order to calculate the cell index doubling time with the xCELLigence RTCA HT Software. The doubling time is the time required for cell index to double based on the curve and thus represents time when whole cell population has performed at least one division. As shown on the right, C2C12 myoblasts divided once in both control media, every 15 hours. (B)\_Myoblasts (n=8) were incubated either with ELV-Depleted Conditioned Medium from C2C12 myoblasts (EDCM-MB), or (C)\_with ELV-Depleted Conditioned Medium from C2C12 myotubes (EDCM-MT). C2C12 doubling time in each medium is shown on the right. (\*  $p$ -values<0.05).

Figure 6: Real time impedance measurement (xCelligence System) of proliferating C2C12 myoblasts. A\_Myoblasts (n=8) were incubated either with DMEM 5% Exosome-Depleted serum (DED) (black), or with DED supplemented either with 2  $\mu$ g of ELV-MB (red) or 2  $\mu$ g of ELV-MT (green). C2C12 doubling time in each medium are shown on the right. (\*\*  $p$ -values<0.01). B\_C2C12 myoblast sizes at t=18h as determined by the Scepter 2.0 handheld automated cell counter. (\*\*  $p$ -values<0.01)

Figure 7: mRNA levels of CCND1 in C2C12 myoblasts cultured in different media. DED: DMEM Exosome-Depleted medium (control); CM-MB: conditioned medium from C2C12 myoblasts; CM-MT: conditioned medium from C2C12 myotubes, EDCM-MB: ELV-Depleted Conditioned Medium from C2C12 myoblasts; EDCM-MT: ELV-Depleted Conditioned Medium from C2C12 myotubes. All values are expressed as means $\pm$ SEM (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

Figure 8: A\_ mRNA levels of Myogenin and SMAD3 48h after the induction of C2C12 differentiation. All values are expressed as means $\pm$ SEM (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ); B\_ Percentage of C2C12 nuclei expressing myogenin as quantified by immunocytofluorescence, 48h after the induction of C2C12 differentiation. Z-scores were calculated to compare 2 percentages. Z-score $>1.96$  were considered as significant (\*).

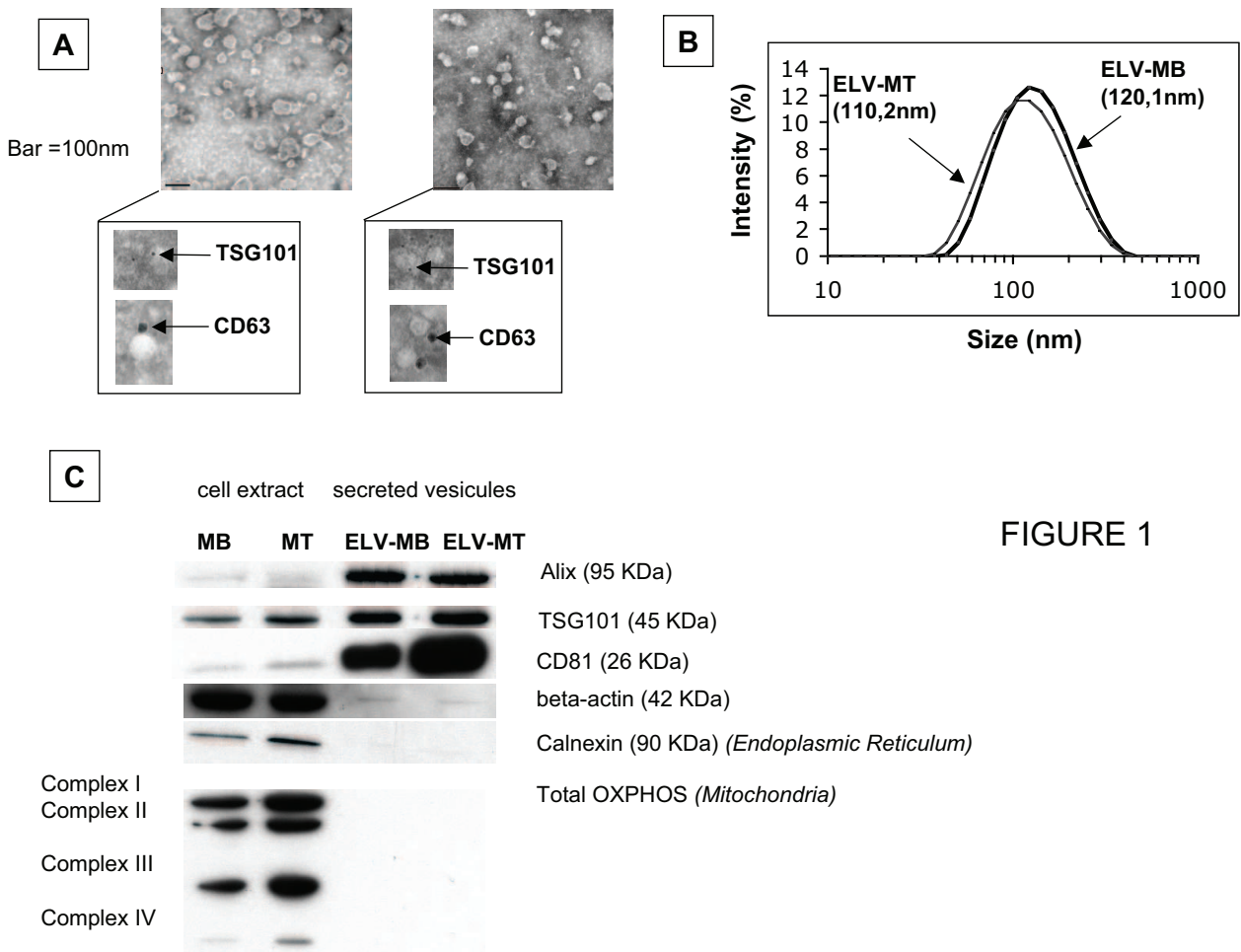


FIGURE 1

# Figure 2

Biological process	pvalue	adj_pvalue
GO:0015031 protein transport	4,80E-15	4,60E-12
GO:0045184 establishment of protein localization	6,70E-15	4,60E-12
GO:0006886 intracellular protein transport	9,51E-15	4,90E-12
GO:0007155 cell adhesion	3,44E-13	1,18E-10
GO:0016192 vesicle-mediated transport	1,29E-12	3,33E-10
GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	6,38E-12	1,46E-09
GO:0006457 protein folding	2,06E-10	4,15E-08
GO:0006913 nucleocytoplasmic transport	2,21E-10	4,15E-08
GO:0030036 actin cytoskeleton organization	8,80E-09	1,39E-06
GO:0006897 endocytosis	1,32E-08	1,82E-06
GO:0051258 protein polymerization	1,40E-07	1,80E-05
GO:0007010 cytoskeleton organization	2,01E-07	2,31E-05
GO:0016044 cellular membrane organization	4,10E-07	4,45E-05
GO:0007399 actin filament organization	8,00E-07	8,25E-05

Molecular function	pvalue	adj_pvalue
GO:0003924 GTPase activity	1,55E-26	1,39E-23
GO:0005525 GTP binding	2,96E-21	1,33E-18
GO:0019001 guanyl nucleotide binding	7,06E-21	2,12E-18
GO:0016462 pyrophosphatase activity	3,23E-18	6,61E-16
GO:0016818 hydrolase activity, acting on acid anhydrides	3,67E-18	6,61E-16
GO:0017111 nucleoside-triphosphatase activity	5,34E-18	7,84E-16
GO:0005509 calcium ion binding	4,48E-10	4,48E-08
GO:0051082 unfolded protein binding	1,20E-09	1,08E-07
GO:0008092 cytoskeletal protein binding	1,64E-07	1,05E-05
GO:0005543 phospholipid binding	7,30E-07	4,11E-05
GO:0003779 actin binding	1,24E-06	6,55E-05
GO:0032403 protein complex binding	1,38E-05	6,90E-04

Cellular component	pvalue	adj_pvalue
GO:0031982 vesicle	1,16E-22	2,59E-20
GO:0031988 membrane-bounded vesicle	5,66E-21	5,96E-19
GO:0031410 cytoplasmic vesicle	8,06E-21	5,96E-19
GO:0016023 cytoplasmic membrane-bounded vesicle	1,15E-20	6,37E-19
GO:0005829 cytosol	7,47E-17	3,32E-15
GO:0000267 cell fraction	1,45E-14	5,38E-13
GO:0005768 endosome	1,30E-13	4,12E-12
GO:0005626 insoluble fraction	1,95E-13	5,42E-12
GO:0042995 cell projection	4,78E-11	1,10E-09
GO:0005624 membrane fraction	4,98E-11	1,10E-09
GO:0005770 late endosome	5,47E-11	1,10E-09
GO:0042383 sarcolemma	2,96E-10	5,05E-09
GO:0044430 cytoskeletal part	7,70E-07	7,77E-06
GO:0015630 microtubule cytoskeleton	3,10E-04	1,64E-03

Figure 3

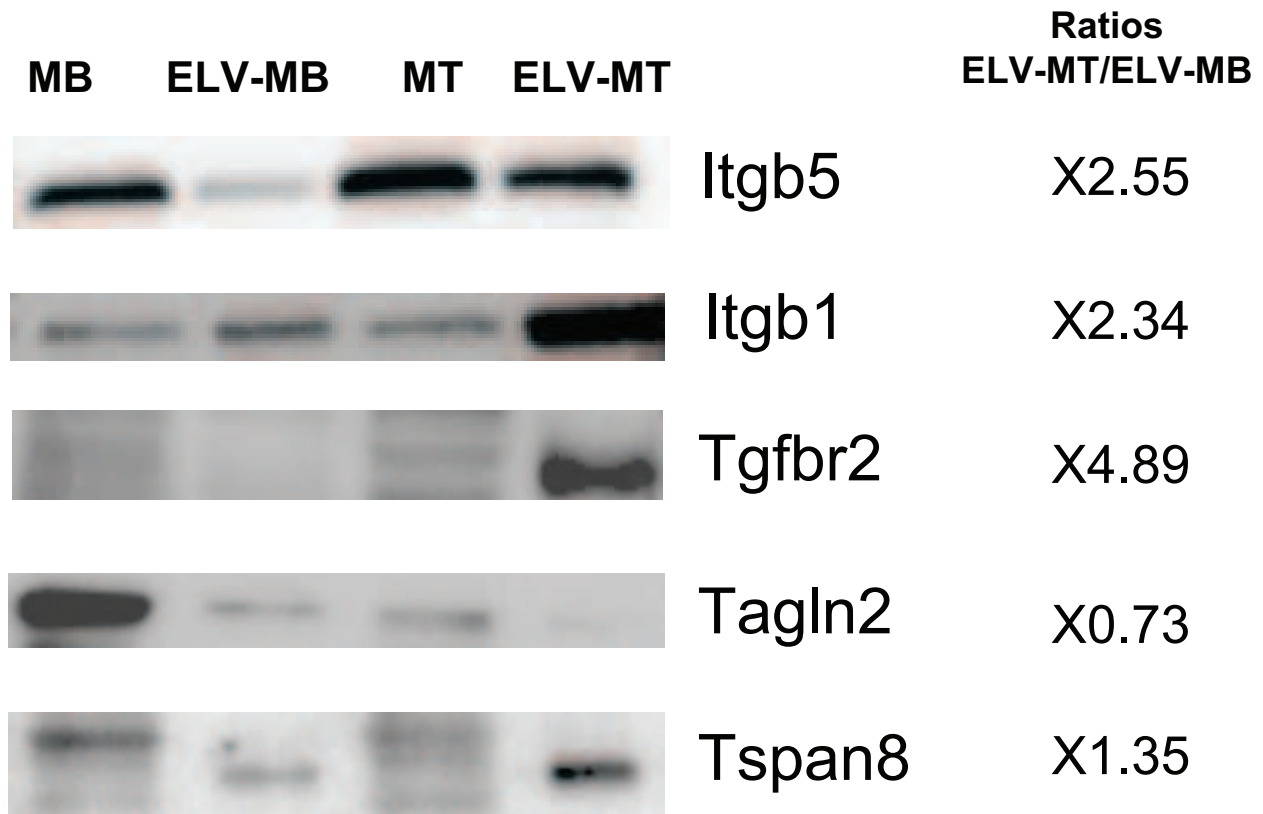
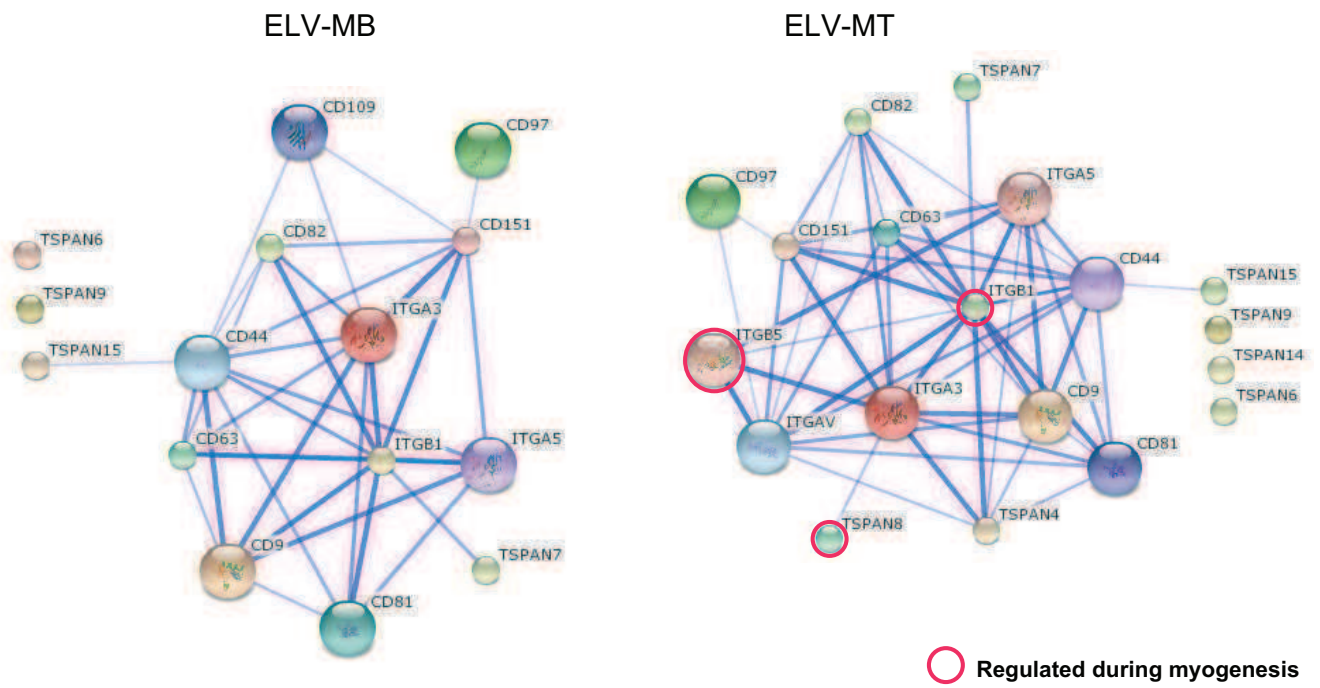




Figure 4



Tetraspanin-integrin network of C2C12 ELVs

# Figure 5

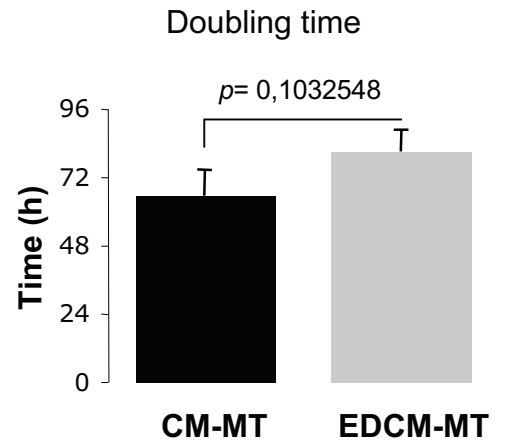
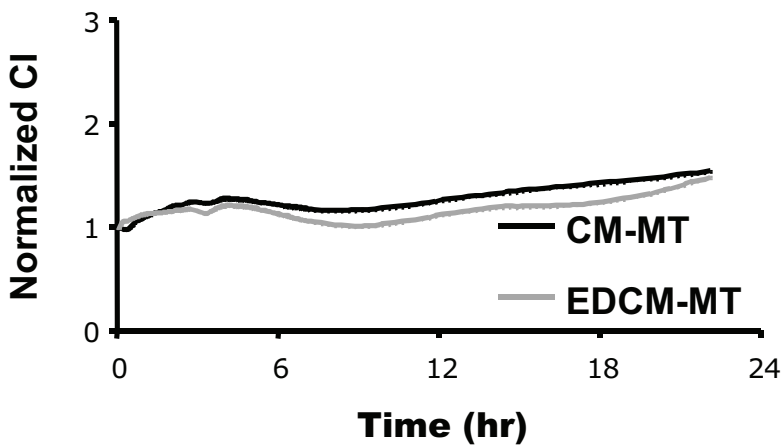
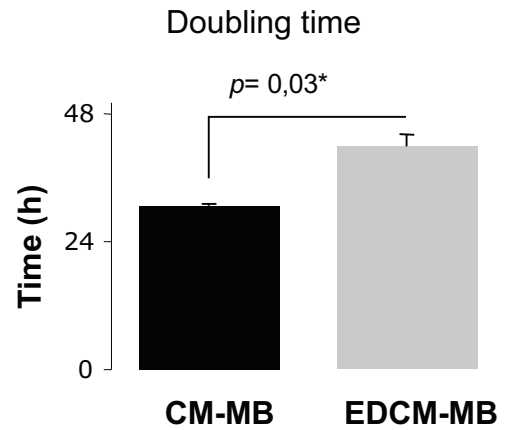
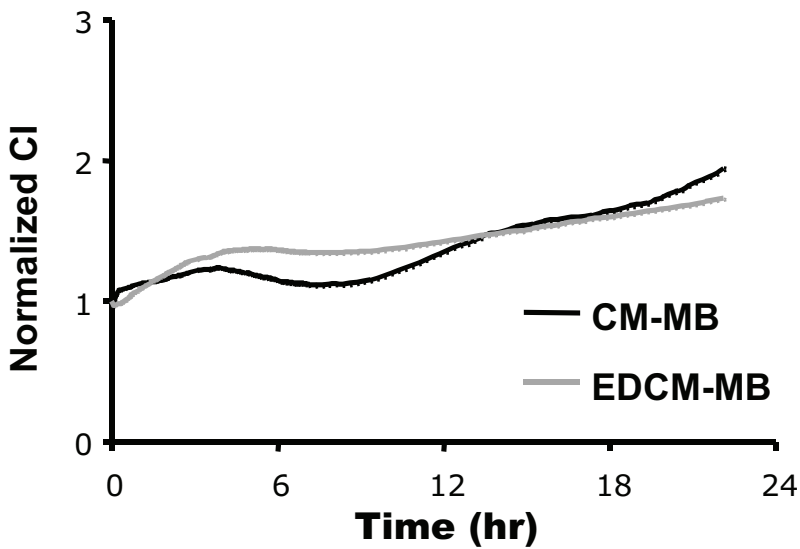
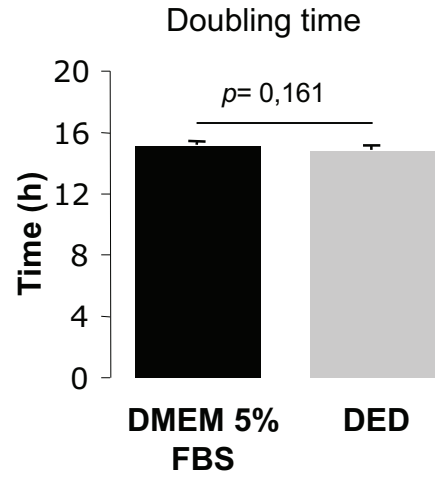
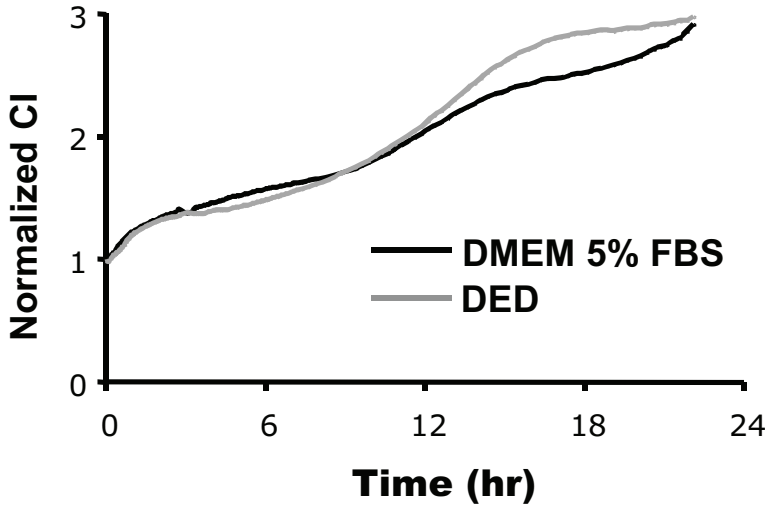
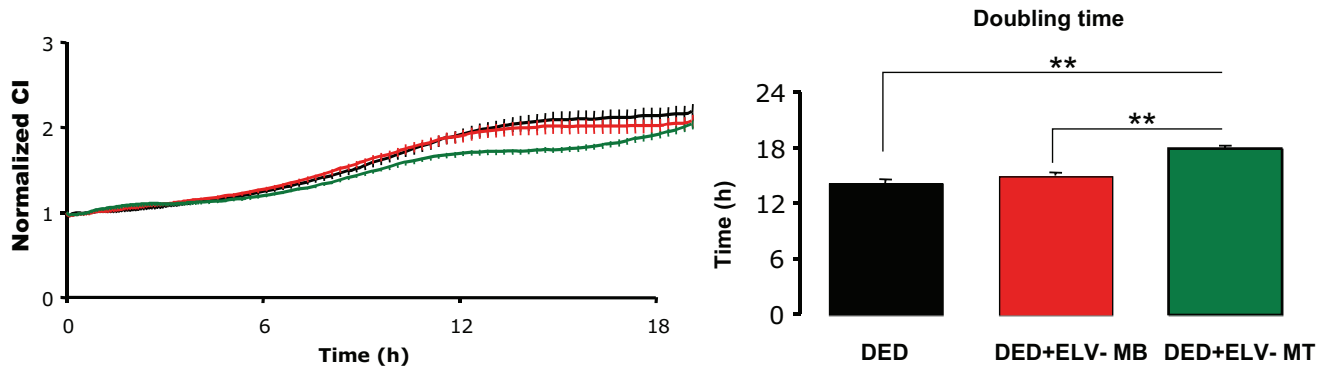


FIGURE 6

A\_Impedance measurement with the xCelligence System



B\_c2C12 cell sizes as determined by the Scepter 2.0 handheld automated cell counter

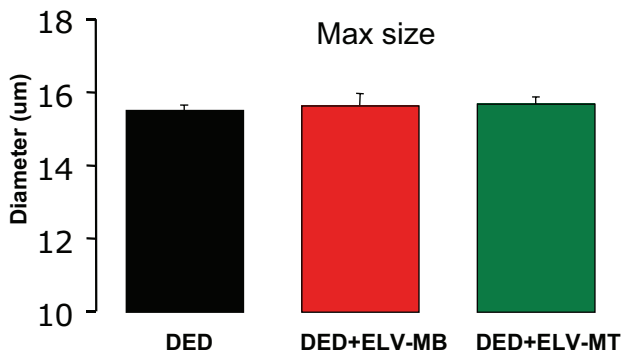


Figure 7

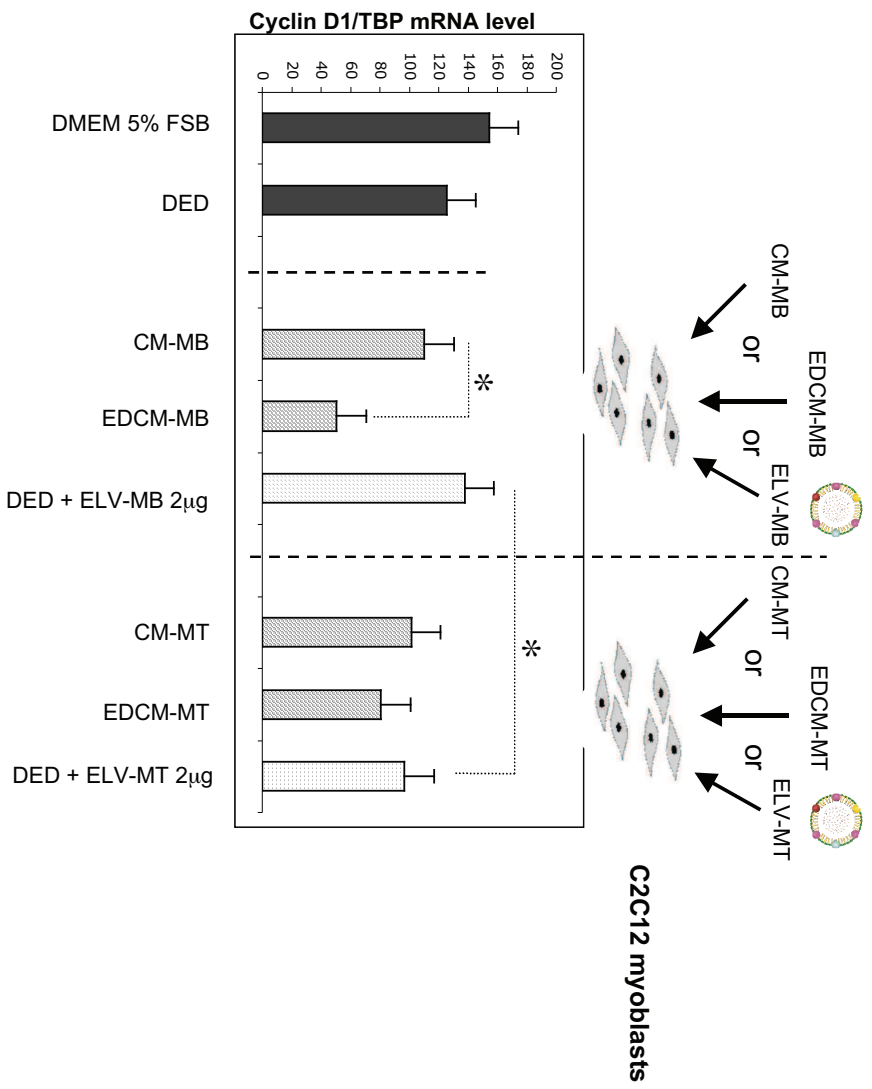
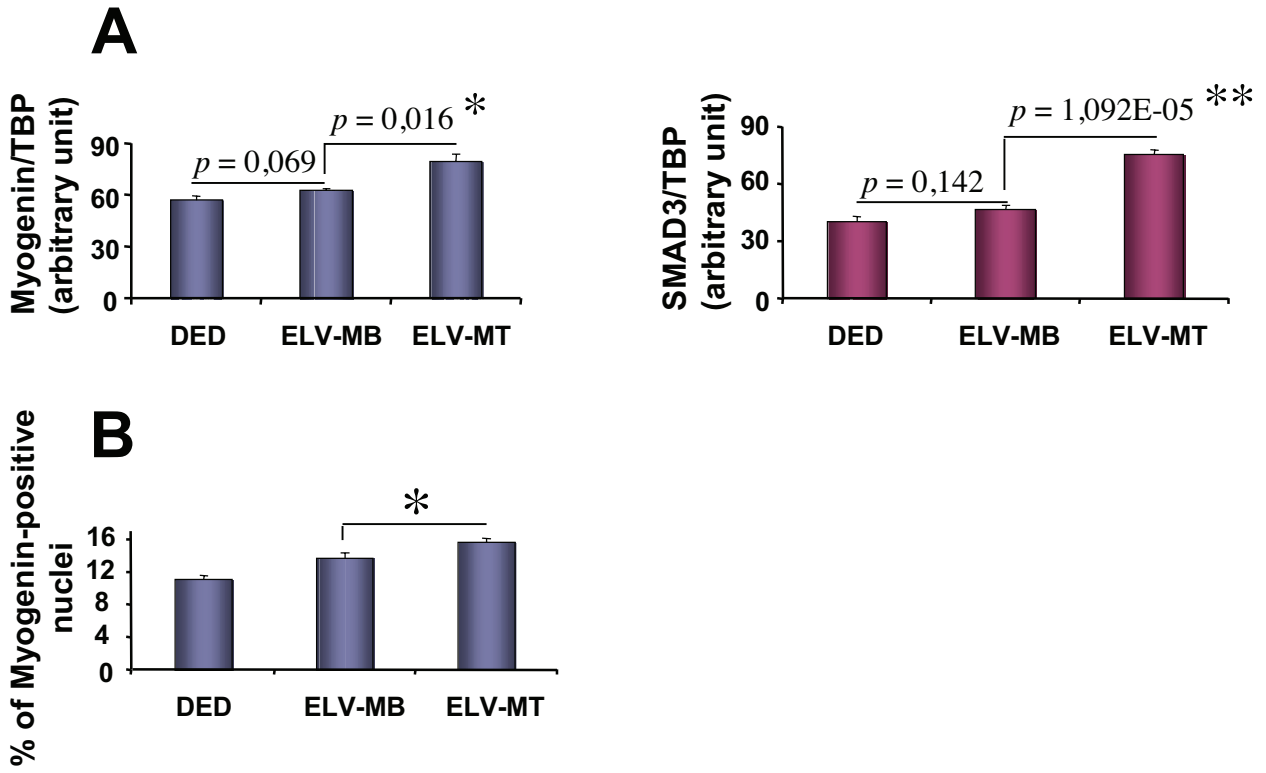


Figure 8



## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: Comparison of C2C12 myoblast proliferation in normal DMEM 10% FBS or with DMEM depleted-exosome 10% FBS. A\_left, cell index determination with the xCellingence System ; right microscopy-based images of C2C12 myoblasts at 80% confluence. B\_ C2C12 myoblast size analysis after 48H proliferation.

Supplementary Figure 2: Light microscopy-based images of undifferentiated myoblasts (day 0) and differentiating cells at various time points (days 2 (2d), 4 (4d), and 8 (8d)) following serum starvation and induction of the myogenic program ((2% Horse Serum (HS) containing exosomes or exosome-depleted). Bar=100nm.

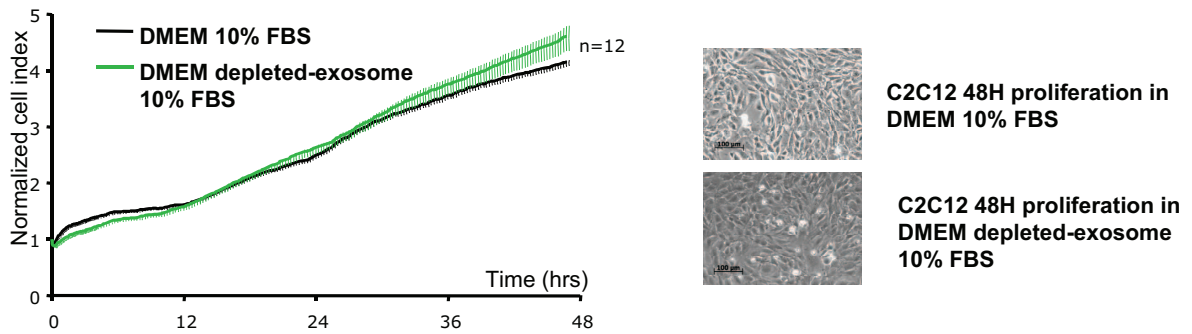
Supplementary Figure 3: Summary of the protocol used to analyse the soluble and ELV fractions of C2C12 myoblast- and myotube-conditioned media.

Supplementary Figure 4 : Effect of ELV depletion in growth media on Cyclin D1 mRNA level. CM-MB and CM-MT: conditioned media from myoblast or myotubes, respectively ; EDCM-MB and EDCM-MT : conditioned medium from myoblast or myotubes depleted of their exosomes by ultracentrifugation. A\_ C2C12 cells were grown in 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) and differentiated with 2% Horse Serum (HS). B\_ C2C12 cells were cultured in 10% FBS and differentiated with 1% FBS. C\_ Rat L6 cells were grown in 10% FBS and differentiated with 2% FBS containing  $10^{-7}$ M arginine vasopressin (AVP). The RT reactions were realized with 600ng of RNA in (A) and 1 $\mu$ g of RNA in (B) and (C).

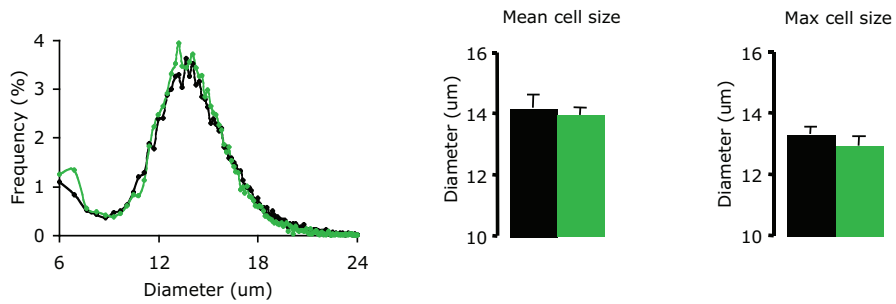
Supplementary Figure 5: Effect of ELV-MB and ELV-MT on myogenin and SMAD3 mRNA level. All values are expressed as means±SEM. Student *t-test* significant *p* values are indicated. A\_ C2C12 cells were grown in 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) and differentiated with 2% Horse Serum (HS). B\_ C2C12 cells were cultured in 10% FBS and differentiated with 1% FBS. C\_ Rat L6 cells were grown in 10% FBS and differentiated with 2% FBS containing  $10^{-7}$ M arginine vasopressin (AVP). The RT reactions were realized with 600ng of RNA in (A) and 1mg of RNA in (B) and (C). Note that the primers used to amplify mouse SMAD3 mRNA could not be use to amplify rat SMAD3 mRNA.

## Supplementary FiGURE 1

### A\_Impedance measurement with the xCelligence System



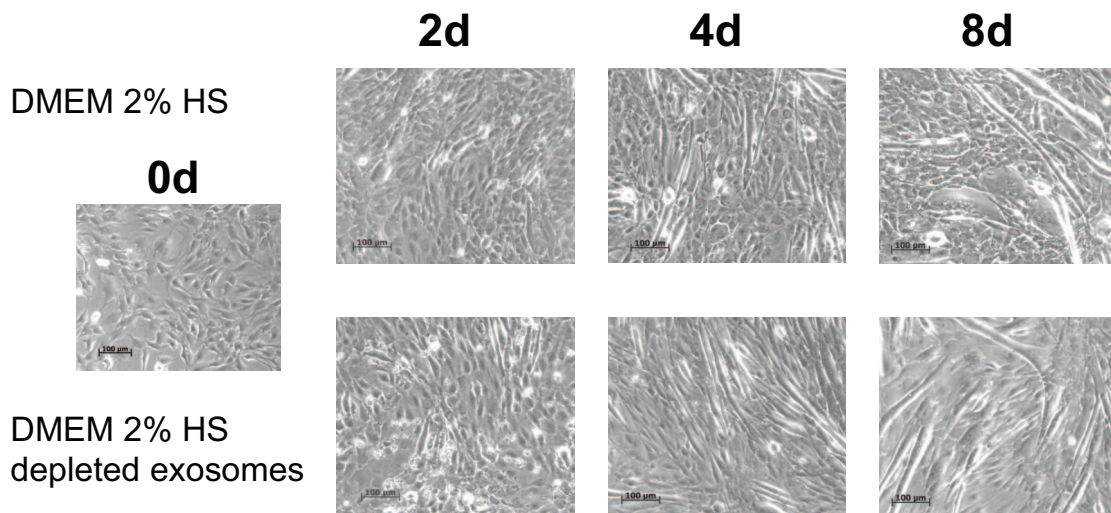
### B\_C2C12 cell sizes after 48H proliferation determined by the Scepter 2.0 handheld automated cell counter



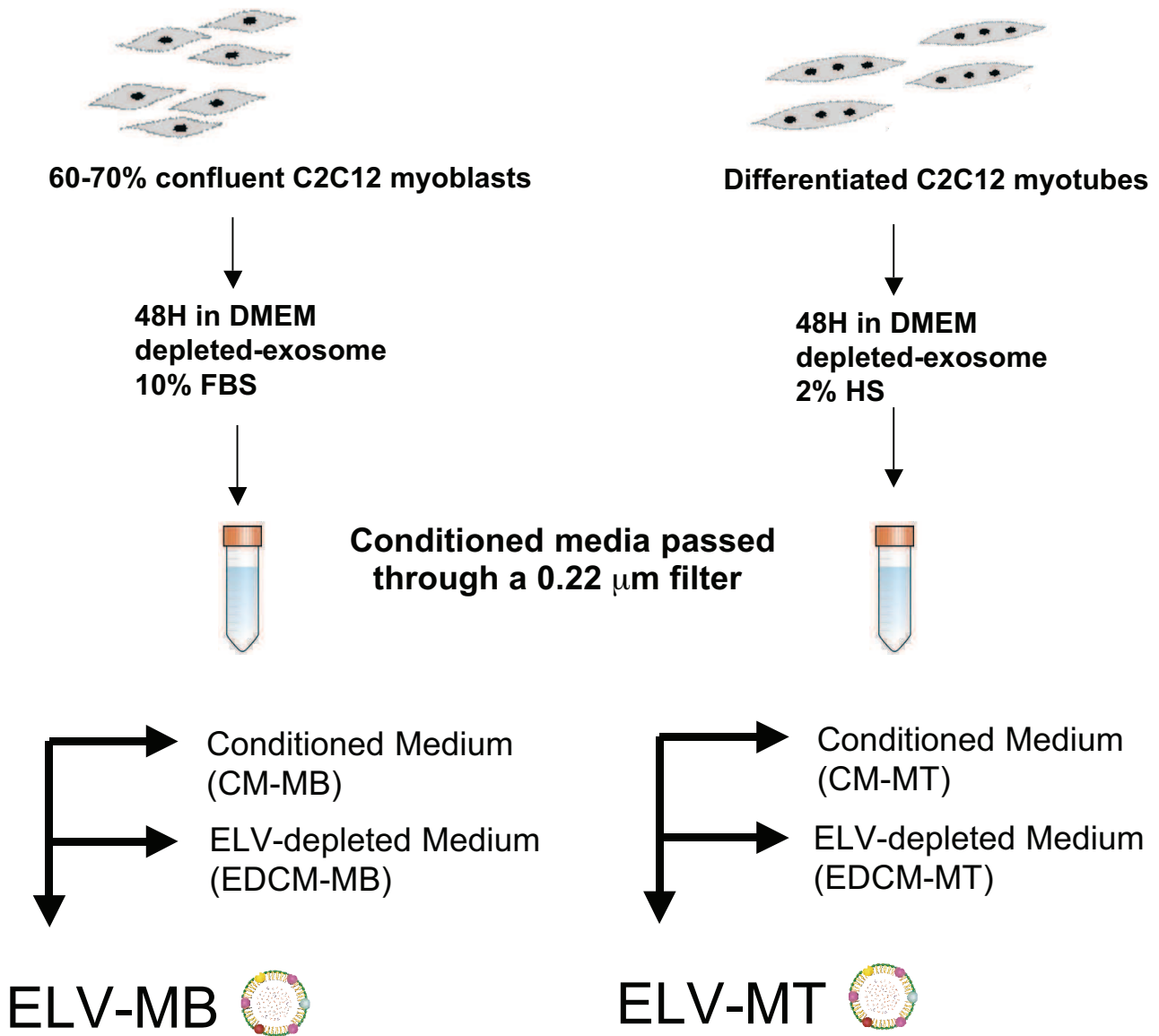


Supplementary FiGURE 2

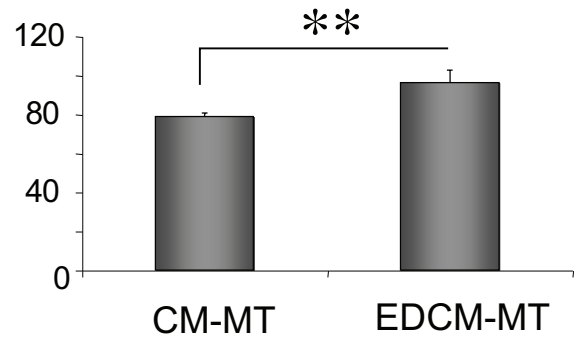
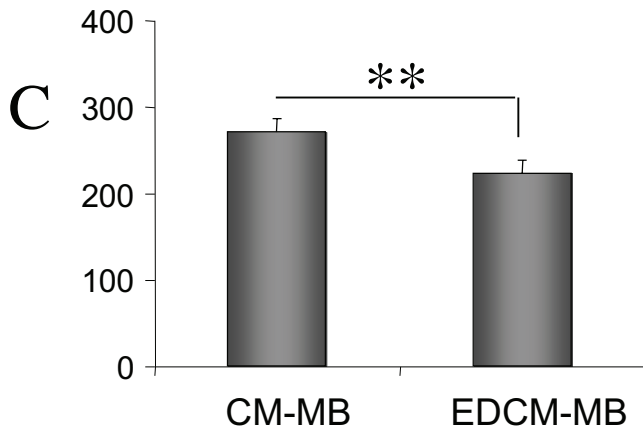
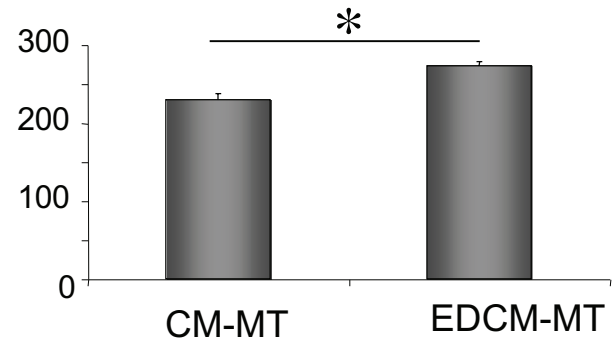
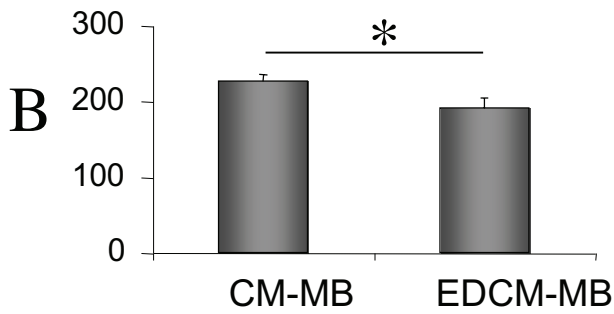
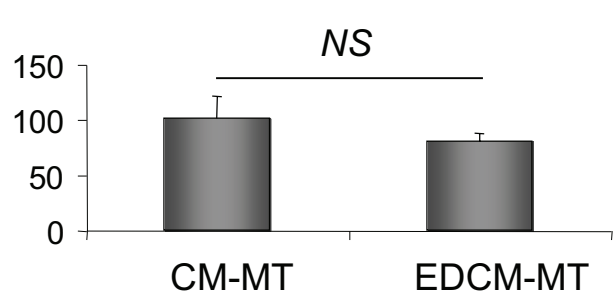
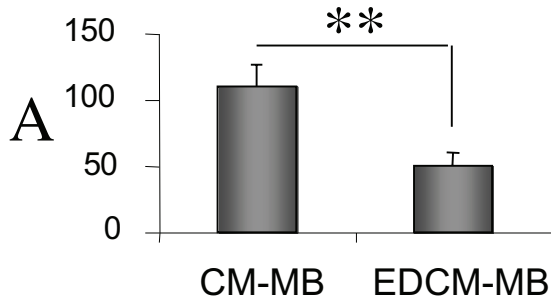
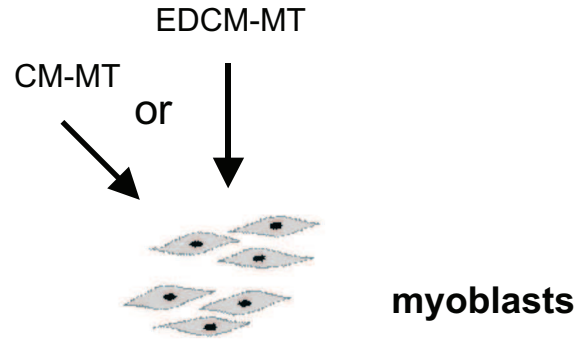
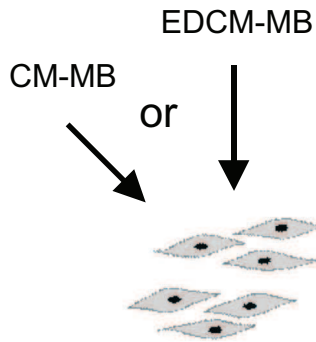
**C2C12 differentiation**



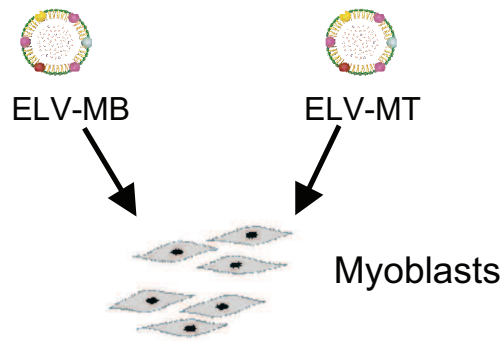
# Supplementary FIGURE 3



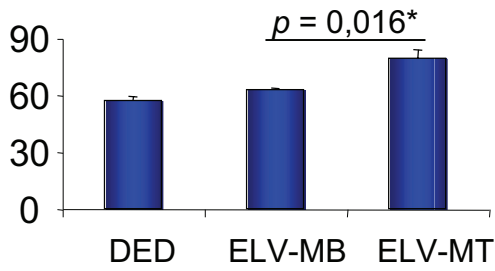
# Supplementary Figure 4



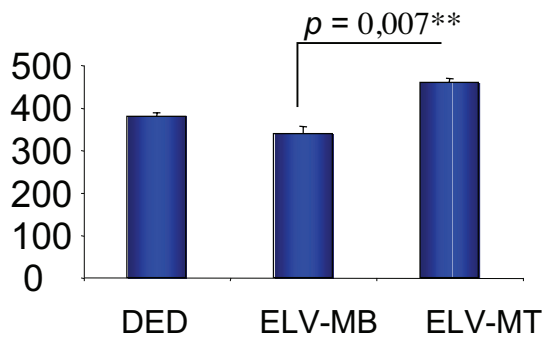
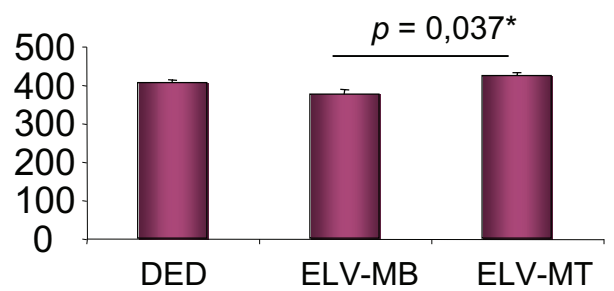
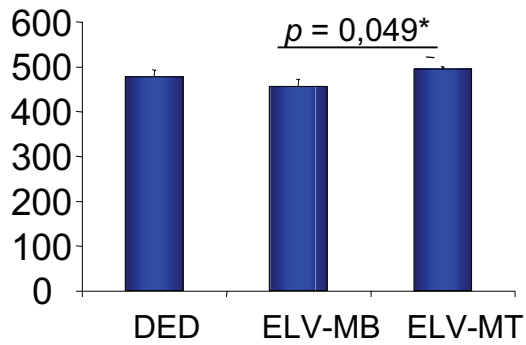
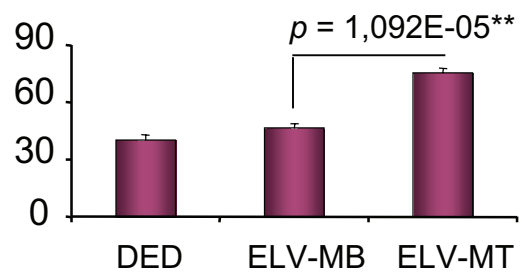
# Supplementary Figure 5



**MyoG/TBP**  
(arbitrary unit)



**SMAD3/TBP**  
(arbitrary unit)



# ARTICLE 2

## **Myotubes sorted specific exosomal miRNAs which regulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation**

Alexis Forterre, Audrey Jalabert, Karim Chikh, Sandra Pesenti, Vanessa Euthine, Aurélie Granjon, Elizabeth Errazuriz, Etienne Lefai, Hubert Vidal and Sophie Rome

*Article soumis dans « Cell communication and signalling »*

## **Myotube-derived exosomal miRNAs down-regulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation**

Alexis Forterre<sup>(1)</sup>, Audrey Jalabert<sup>(1)</sup>, Karim Chikh<sup>(1)</sup>, Sandra Pesenti<sup>(1)</sup>, Vanessa Euthine<sup>(1)</sup>, Aurélie Granjon<sup>(1)</sup>, Elizabeth Errazuriz<sup>(2)</sup>, Etienne Lefai<sup>(1)</sup>, Hubert Vidal<sup>(1)</sup>  
and Sophie Rome<sup>(1)\*</sup>

(1) Laboratory CarMeN (INSERM 1060, INRA 1235, INSA), University of Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69600 Oullins, FRANCE

(2) Centre Commun d'Imagerie de Laënnec (CeCIL), SFR Santé Lyon-Est, University of Lyon, FRANCE

\* Contact Information

Dr. Sophie Rome, srome@univ-lyon1.fr, (+33) 42623 5920 ; fax (+33) 42623 5916

*Running Head:* microRNAs from muscle cell exosomes

*Key Words :* exosomes, skeletal muscle, differentiation, microRNAs, Sirtuin 1

**Background :** Studies over the last 5 years have demonstrated that microRNAs (miRNAs) are detectable outside of cells and are found in various body fluids. They are enclosed in small membranous vesicles, like exosomes, which are derived from the late endosomal system and are constitutively secreted. It has recently been established that exosomes can mediate intercellular cross-talk under normal and pathological conditions through the transfer of specific miRNAs. As muscle cells secrete exosomes, we addressed the question of whether skeletal muscle (SkM) exosomes contained specific miRNAs and whether they could act as ‘endocrine signals’ during myogenesis.

**Results:** We compared the miRNA repertoires found in exosomes released from C2C12 myoblasts and myotubes and found that certain muscle cell miRNAs were exported into exosomes (171 and 182 miRNAs, in exosomes from myoblasts and myotubes, respectively). Interestingly, some miRNAs were expressed at higher levels in exosomes than in their donor cells and *vice versa*, indicating a selectivity in the incorporation of miRNAs into exosomes. Moreover miRNAs from C2C12 exosomes were regulated during myogenesis. The predicted target genes of these regulated exosomal miRNAs are mainly involved in the control of important signaling pathways for muscle cell differentiation (e.g.; Wnt signaling pathway). We also demonstrated that exosomes from myotubes could transfer small RNAs (miRNAs and also siRNA) into myoblasts. Both miR-133a and miR-145, which are not expressed in proliferating myoblasts, were detected in myoblasts following incubation with myotube exosomes but not with myoblast exosomes. Bioinformatic prediction indicated that Sirtuin 1 (Sirt1) is a target gene of multiple myotube-exosome miRNAs. Using the Sirt1 full length 3'-UTR region, we demonstrated that myotube-secreted miRNAs are functional and can silence Sirt1 in myoblasts. Since Sirt1 regulates muscle gene expression and differentiation, our results indicate that myotube-secreted miRNAs could contribute to the commitment of myoblasts to differentiation.

**Conclusion:** Until now myokines in muscle cell secretome provided a conceptual basis for communication between muscles and other organs. Here, we demonstrate that miRNA exosomal transfer would be a powerful means by which gene expression is orchestrated during myoblast cell differentiation to regulate SkM metabolic homeostasis.

## Background

MicroRNAs (miRNAs) are a class of evolutionally conserved non-coding RNAs of 19-22 nucleotides that function as negative regulators of gene expression. Originally discovered in *C. elegans*, these small RNAs regulate fundamental cellular processes in diverse organisms [1, 2]. MiRNAs are encoded within the genome and are initially transcribed as primary transcripts that can be several kilobases in length (pri-miR). Primary transcripts are successively cleaved by two RNase III enzymes, Drosha in the nucleus and Dicer in the cytoplasm, to produce 70 nucleotide long precursor miRNAs (pre-miR) and then mature miRNAs, respectively. Mature miRNAs regulate gene expression post-transcriptionally by binding to target mRNAs in association with the multiprotein RNA induced silencing complex (RISC) [3]. Three mechanisms have been described for gene regulation *via* miRNA : (i) translation repression, (ii) direct mRNA degradation, and (iii) miRNA-mediated mRNA decay. Recent data have suggested that the mechanism of repression is predominantly via decrease in mRNA target stability [4]. MiRNA activity and abundance is also regulated at various levels ranging from transcription and processing to target site binding and miRNA stability [5]. Bioinformatic analyses indicate that miRNAs can regulate multiple target mRNAs, and individual mRNA can be targeted by several miRNAs, providing enormous complexity [6].

Induction of the loss of all miRNAs in mice by depleting the enzyme Dicer, causes arrested development during gastrulation, before the body plans are fully configured [7]. In addition, the levels of individual miRNAs are dramatically altered in different cell types and different developmental stages, confirming that miRNAs play a major role in cell growth, differentiation and programmed cell death. As a consequence of this widespread influence, it is not surprising that miRNA deregulation is a hallmark of several pathological conditions, including cancer [8], inflammation [9], neurological disorders [10] and metabolic disorders [11].

All these data largely assume that miRNAs reside and elicit their regulatory actions within their cell of origin. However, studies during the past 5 years have demonstrated that miRNAs are found not only intracellularly, but are also detectable outside of cells, including in various bodily fluids (*e.g.* ; serum, plasma, saliva, urine and milk) [12]. This phenomenon raises questions about the biological function of such extracellular miRNAs. They are enclosed in small membranous vesicles (*e.g.* in exosomes, shedding vesicles and apoptotic bodies) or packaged with RNA-binding



proteins (e.g. high-density lipoprotein, Argonaute 2 and nucleophosmin 1) [13-16]. In the latter case, extracellular miRNAs may represent by-products of dead/dying cells which persist due to their stability within the protein complex. The extent to which free miRNAs act in a paracrine manner remains to be investigated. For miRNAs exported in exosomes, compelling evidence supports their role in a broad range of physiological and pathological processes.

Exosomes are 50-150nm diameter membranous vesicles derived from the late endosomal system which are released from cells both constitutively and upon induction, under normal and pathological conditions [17]. The endosomal system controls the uptake and processing of various types of macromolecules from the extracellular milieu and the plasma membrane into the cell. It consists of interconnected vesicular organelles *i.e.* ; the primary endocytic vesicles, the early endosomes, the recycling endosomes, the late endosomes and the lysosomes [18]. Inward budding of endosomal membranes results in the accumulation of intraluminal vesicles. These late endosomes are called multivesicular bodies (MVBs). MVBs can either fuse with lysosomes to degrade their intraluminal cargo, or fuse with the plasma membrane to release their intraluminal vesicles, as exosomes, into the extracellular milieu. This process of directed transport relies on several components of the endocytic machinery such as Rab GTPases (Rab11, Rab27a and b), cytoskeleton regulatory proteins, molecular motors such as myosin, and SNAREs [19]. Exosomes bear surface receptors/ligands of the original cells and have the potential to selectively interact with specific target cells [17, 20, 21].

In addition to numerous lipids and proteins, exosomes contain mRNAs and miRNAs [22-24]. Previous studies have demonstrated that exosomes can horizontally transfer mRNAs to other cells, which can then be translated into functional proteins in the new location [22, 23, 25]. Similarly, miRNAs can be transferred by an exosomal route and further exert gene silencing in the recipient cells [22]. These findings shed new light on the physiological relevance of secretory genomic information by exosomes, and indicate a role of exosomes as new mediators of intercellular cell signaling between neighbouring cells and also between distant tissues, which could act independently but synergically with soluble growth factors and hormones.

Skeletal muscle (SkM), the largest organ in the human body, is responsible for whole-body metabolism, energy homeostasis and locomotion, and serves as a body protein pool. It is a highly adaptable tissue, responding to numerous environmental

and physiological challenges by changing its phenotypic profile in terms of size as well as composition. During the last decade, SkM-secreted proteins have been identified with important roles in intercellular communications [26-28]. Among them, a large number of soluble peptide hormones and cytokines, called myokines, are capable of triggering homeostasis adaptations in other peripheral organs (e.g. pancreas, adipose tissue) [26] or are involved in the process of myogenesis (e.g. IL-4, IL-7 and IL-13) [27, 28]. Recently, it has been demonstrated that muscle cells secrete nanoparticles with exosomal properties [29]. Because exosomes released from donor cells can be taken up by recipient cells, where an array of biological processes including cell proliferation and differentiation can be affected [30, 31], we examined whether skeletal muscle exosomes contained specific miRNAs and whether these miRNAs could act as endocrine signals during myogenesis. Using qRT-PCR, we analysed and compared the miRNA repertoires within exosomes from C2C12 myoblasts and myotubes. We then determined whether exosomes could transfer miRNAs from myotubes to myoblasts and thus regulate gene expression in the recipient cells. By using Sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2 homolog) (Sirt1) the reporter gene, we present evidence that exosome miRNAs secreted by myotubes are able to silence Sirt1 at the protein level, in myoblasts. As Sirt1 regulates muscle gene expression and differentiation [32], our results show that myotube-exosome miRNAs could contribute to the commitment of myoblasts in the process of differentiation.

## Results

In this study we purified exosomes from conditioned media of C2C12 myoblasts and myotubes by differential centrifugations coupled with membrane filtration (0.2 $\mu$ m) to eliminate large contaminating extracellular vesicles. Electron microscopic analysis showed that the resulting pellet contained a homogenous population of nanovesicles at the expected size of 50-150nm which expressed the exosomal marker CD63 (Figure 1) [33]. We purified total RNA from 3 independent preparations of exosomes, and analyzed their miRNA populations by real-time quantitative PCR.

### MiRNA profiling in C2C12 cells and in released exosomes

For each miRNA, the threshold cycle (Ct) was calculated by the ABI 7900 Sequence Detection System software. Raw Ct values considered "undetermined" by the software or at a level  $\geq 40$  cycles, were excluded from analysis. For each TaqMan Low Density Array, quality controls were performed on the raw data by checking internal controls and using box plot diagrams. Since the currently used normalisation factor mammU6 plotted in each card was not stably expressed in our different samples we used the mean expression level of expressed miRNAs for normalization [34]. Using these criteria, 171 and 182 miRNAs were detected in myoblasts and myotubes, respectively (Figure 2). The majority of the miRNAs expressed in C2C12 cells were sorted into exosomes (Figure 2). In addition, exosomes from C2C12 cells also contained snoRNA135 and snoRNA202, which are small RNA molecules that primarily guide chemical modifications of other RNAs (*e.g.* ribosomal RNAs and transfer RNAs) and scRNA Y1, a small cytoplasmic RNA and component of the Rho ribonucleoprotein complex.

Comparisons of the sub-sets of miRNAs exported in exosomes with the total population of miRNA expressed in C2C12 cells enabled identification of 2 groups of 28 miRNAs which were not detected in exosomes secreted from myoblasts and myotubes (Figure 2). Among them, miR-147, miR-30b\*, miR-467c, miR-615-3p, miR-669a, miR-677, miR-28\* and miR-29-2\* were never found in muscle-secreted exosomes. Conversely, 3 and 2 miRNAs respectively were not detected in C2C12 muscle cells by qRT-PCR, but were found in myoblast- and/or myotube-secreted exosomes. In addition, 23 and 20 miRNAs respectively displayed higher expression

in myoblast- and myotube-secreted exosomes compared with C2C12 cells, estimated by the mean of Ct values (Table 1).

Together, these data indicate that C2C12 muscle cells exported only a sub-population of miRNAs into exosomes. In addition some miRNAs could not be identified by qRT-PCR in C2C12 cells even using a pre-amplification step before the PCR reaction. To determine whether these results were specific to the C2C12 murine muscle cells, we compared the population of miRNAs from these cells with the population of miRNAs identified previously in exosomes from other murine cell lines (*i.e.* immature and mature Bone marrow (BM) cells, and mast cells (MC9)) [22, 35]. We identified a sub-group of 21 miRNAs that were always exported whatever the cell type and the state of differentiation [22, 35]. On the other hand, we found that miR-147, miR-467c and miR-669a were never exported in exosomes.

### **miRNAs in C2C12 exosomes are regulated during myogenesis**

As it has been previously shown that miRNAs are regulated during muscle cell myogenesis [36], we predicted that miRNAs exported into exosomes might be similarly regulated. As shown in Figure 3, 108 miRNAs were differentially expressed between myoblasts and myotubes, *i.e.* 48 were up- and 60 were down-regulated during the process of C2C12 differentiation. Among these were miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-222, miR-223, miR-126, previously identified for their important roles during muscle cell differentiation [37-39]. Besides these intracellular regulations, we found that 86 miRNAs expressed in exosomes were also differentially expressed between exosomes from C2C12 myoblasts and exosomes from C2C12 myotubes (*i.e.* 39 were up- and 47 were down- regulated) (Figure 3). Among them, 18 were up- and 19 were down-regulated both in C2C12 cells and exosomes during differentiation (Figure 3). One miRNA, let-7d, was inversely regulated in exosomes compared with cells, during differentiation (down vs up).

### **Functional analysis of target genes of exported miRNAs**

Target genes of the 86 exosome-secreted miRNAs regulated during myoblast differentiation were predicted by bioinformatics using TargetScan 6.1 (<http://www.targetscan.org/>). Among the 47 down-regulated miRNAs, 31 had predicted target genes (n=4641 genes) and among the 39 up-regulated miRNAs, 31 also had predicted target genes (n=4232 genes). As some genes were targeted by

both up- and down-regulated exosome-miRNAs, we removed these common genes to perform functional analysis. Functional analysis of exosome-secreted miRNA target genes were thus realized on 2021 genes, for down-regulated miRNAs and 1612 genes, for the up-regulated miRNAs, by using Babelomics 4.3 (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>). Figure 4 shows KEGG pathways that are most significant in terms of containing more genes than expected ( $P < 0.05$ ). The majority of the significant categories were signaling pathways.

### **Myotube exosomes can transfer miRNA in myoblasts**

As exosome miRNA profiles from myoblasts and myotubes were different, we postulated that these secreted-miRNAs would have specific roles during the process of myogenesis. To investigate whether transfer of specific miRNAs could occur between myotubes and myoblasts, we focused on miR-133a and miR-145, two highly expressed miRNAs in muscle, which were induced in exosomes during C2C12 differentiation (Figure 4). These two miRNAs have been shown to play central regulatory roles in muscle growth, differentiation, and function [40, 41]. One day after seeding, C2C12 myoblasts were incubated with exosomes purified from conditioned medium from myotubes (EXO-MT) for 36h. As a control, we used exosomes from myoblasts (EXO-MB). As shown in figure 5, the level of miR-133a and miR-145 were significantly higher in myoblasts treated with EXO-MT, compared with myoblasts treated with EXO-MB, indicating that these two miRNAs have likely been transferred.

It had previously been shown that miRNAs can regulate the expression of other miRNAs [42] (*i.e.* ; miR-133a), and also that they can regulate transcription factors important for myogenesis which, as a feed-back loop, can also regulate these miRNAs (*i.e.* ; MyoD and miR-133a [42]). It was therefore important to demonstrate more definitely that EXO-MT could transfer small RNAs and that the observed increase of miR-133a and miR-145 levels in myoblasts was not just the result of indirect regulation. As exosomes can promote the transfer of exogenous siRNA [43], which are similar in length to endogenous miRNAs, we decided to use C2C12 EXO-MT as a vehicle for siRNA. We transfected differentiated myotubes with siRNA to decrease the expression of integrin *Itga7*, which is developmentally regulated in muscle cells and whose expression is strongly induced during myoblast proliferation and differentiation [44]. We verified that *Itga7* expression was strongly reduced in C2C12 myotubes (supplementary figure 1) and purified the exosomes released by

these cells. C2C12 myoblasts were incubated in the presence of EXO-MT from siRNA *Itga7*-treated cells and with control exosomes. As shown in Figure 5, the mRNA level of *Itga7* in myoblasts was significantly reduced in the presence of EXO-MT from siRNA *Itga7*-treated cells indicating that these exosomes could transfer siRNA *Itga7* from myotubes to myoblasts, and as a consequence, could decrease the expression of *Itga7* in myoblasts. These data indicate that exosomes can horizontally transfer small RNAs between myotubes and myoblasts.

### **Myotube miRNAs exported in exosomes can regulate myoblast *Sirt1* gene**

We then determined whether EXO-MT miRNAs could regulate the expression of genes in myoblast cells. As we had found that combinations of different miRNA binding sites in 3'-UTRs have synergistic effects on gene expression [45] we focussed this study on the genes targeted by multiple exosome miRNAs. The list of the top 20 genes putatively targeted by different miRNAs, which are regulated during myogenesis (Figure 3), is given in Table 2. *Sirt1*, a NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase enzyme which is an important protein for muscle precursor cell proliferation [46], myoblast survival [47] and muscle differentiation [32] was included in this list. We showed that *Sirt1* protein is decreased during C2C12 differentiation (Figure 6A), at both protein and mRNA levels (Figures 6A and 6B). Numerous miRNAs can regulate *Sirt1* and among them miR-22 and miR-181a were expressed in EXO-MT (Figure 4) [48]. To demonstrate that EXO-MT miRNAs could collectively regulate gene expression in myoblasts, we performed luciferase reporter assays with full-length 3'-UTR constructs of *Sirt1* (Figure 6C). As shown in Figure 6D, luciferase activity was significantly reduced when myoblasts had been in contact with EXO-MT during proliferation. This result correlated with a reduced *SIRT1* expression at both protein and mRNA levels in myoblasts (Figure 6 E and 6F). By contrast, addition of EXO-MB had no effect on *Sirt1* 3'-UTR luciferase activity. Since we had demonstrated that miR-133a may be transferred into myoblasts through the exosomal route (Figure 5), we determined whether this miRNA could participate in the down-regulation of *SIRT1*. Overexpression of miR-133a in C2C12 cells led to the down-regulation of *Sirt1* mRNA (Figure 6F). On the other hand miR-1, which is also highly expressed in EXO-MT, did not induce this down-regulation. These results indicated that miR-133a, contained in EXO-MT, may participate in the down-regulation of *Sirt1* in myoblasts.



## Discussion

Almost all aspects of skeletal muscle (SkM) development and homeostasis are regulated by miRNAs, either directly or indirectly [36]. Several muscle-specific miRNAs have been found to be important for normal myoblast differentiation, proliferation, and muscle remodeling in response to stress and hormones [45, 49]. In addition to these intracellular regulations, the data presented in this study establish, for the first time, that miRNAs from muscle cells can also be sorted into exosomes and are likely to be involved in muscle cell differentiation.

Among the exported miRNAs, 37 were regulated in the same way as in the C2C12 cells, during myoblast differentiation (18 up and 19 down-regulated). Exosome up-regulated miRNAs included miR-181a, 146a, miR-145, miR-1, miR-24, miR-206, miR-133a, miR-133b and miR-378 which are well-known for their intracellular actions in control of muscle cell differentiation [37, 40, 41, 50-53], along with let-7d and let-7e, that are implicated in cell growth arrest [54, 55]. The population of exosome down-regulated miRNAs included miR-381 and miR-93 involved in cell proliferation [56, 57]. As exosome miRNA profiles changed during muscle cell differentiation, we postulated that these exported miRNAs would have a role in the process of myogenesis. Indeed, it has been previously found that exosomes can transfer miRNAs between different cell types and may silence gene expression in the recipient cells [22, 35, 58, 59]. Our results showed that two miRNAs (*i.e.* ; miR-133a and miR-145) which are normally not expressed in proliferating myoblasts, were detected in myoblasts incubated with myotube exosomes, but not with myoblast exosomes. These data strongly suggested that during myogenesis, myotubes and myoblasts could transfer regulatory genetic information.

Importantly, our data also demonstrated that not all miRNAs can be incorporated into exosomes. Surprisingly, some miRNAs were inversely regulated in exosomes compared with their cytoplasmic regulation during myogenesis. Similar observations have been made by Montecalvo and co-workers [35] who recently demonstrated that exosomes isolated from murine dendritic cell (DC) culture media enclosed >200 miRNAs, with 5 uniquely detected in exosomes from immature DCs and 58 exclusively present in exosomes from mature DCs. Among them, we identified 21 miRNAs that were also exported in exosomes from C2C12 muscle cells. In addition, we found three miRNAs that were never exported in exosomes from C2C12 and dendritic cells (*i.e.* ; miR-147, miR-467c and miR-669a). Taken



altogether, these data indicate that the packaging of specific miRNA populations into muscle secreted exosomes seems to be selective and could be conserved between distant cell types [58, 60].

To date, the mechanisms controlling the sorting of miRNAs into exosomes remains unclear. The earliest role proposed for exosomes was to shed unwanted proteins from cells undergoing terminal differentiation, in order to reduce their intracellular concentrations. This could also be the case for miRNAs, as we observed that miR-133a, miR-133b, miR-1 and miR-206 have the highest increase of expression concomitantly in cytoplasm and in exosomes, during C2C12 differentiation (data not shown). Other studies support the concept that association with proteins of the RNA-induced silencing complex (RISC) controls the packaging of miRNAs in exosomes [61] because components of the RISC complex have been detected in exosomes isolated from monocytes [61] and reticulocytes [62] (*e.g.* AGO2). However, of the 146 studies reported in the Exosome database (<http://www.exocarta.org/>), only one reported the identification of AGO2, using a proteomic approach [62]. Moreover, we recently performed a comparative proteomic analysis of myoblast and myotube exosomes and did not detect any protein related to the RISC complex in exosomes from C2C12 muscle cells (data not shown). A recent study demonstrated that ceramide, whose biosynthesis is tightly controlled by neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2), regulated the secretion of exosomal miRNAs. It also provided evidence that the endosomal sorting complex required for the transport system (ESCRT) was unnecessary for the release of miRNAs [58, 63].

Bioinformatic analysis revealed that predicted target genes of the miRNAs regulated in exosomes during differentiation were mainly involved in the control of signaling pathways. Particularly, the Wnt signaling pathway was predicted as the most significant targeted pathway by those exosome-miRNAs which were down-regulated during myogenesis. It is known that several Wnt signaling components are up-regulated during the transition from cell proliferation to myogenic differentiation [64] and that some miRNAs are implicated [65]. Based on our data, we suggest that part of this up-regulation would come from the concomitant decreased expression of both intracellular and exosome repressor miRNAs. To corroborate this hypothesis, we demonstrated that exported miRNAs from muscle cells were collectively functional. Using an 'in silico' approach we determined the target genes of the myotube-secreted miRNAs, and focused on those with putative multiple binding sites

in their 3'-UTR regions. Sirt1, a gene involved in muscle cell proliferation [32] and predicted to be targeted by 6 different miRNAs present in myotube exosomes (two of them being experimentally validated [48]), was used as reporter gene. Our data showed that miRNAs from myotube exosomes negatively regulated the expression of Sirt1 in myoblasts. As reduction of the level of endogenous Sirt1 augments muscle gene expression and causes increased cell differentiation [32], our result supported the concept that the exosomal transfer of silencing RNAs may potentially be a new powerful means of orchestrating gene expression during myogenesis. Besides its important role in myogenesis [32], Sirt1 is also involved in mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation, and provides a link between energy homeostasis and SkM growth and development [66].

Finally, we have also found that exosomes from myotubes are able to transfer other small RNAs, like siRNA, in myoblasts, raising very exciting possibilities for therapeutic uses. Current techniques for small RNA transfer use viruses or synthetic compounds as delivery vehicles. The use of exosomes to deliver siRNA and miRNA would potentially be better tolerated by the immune system and also would be useful to target a specific tissue. Recently, Alvarez-Erviti and co-workers (2011) were able to target exosome transfer of siRNAs from dendritic cells to brain, by expressing specific neuron-targeting proteins at the dendritic-secreted exosome surface [43]. In our study, we observed that the muscle-specific integrin ITGA7 was exported in exosomes from myotubes (supplementary figure 1). This integrin has never been described in exosomes from other tissues or other cell types (see Exocarta, <http://www.exocarta.org/>). Recently it has been found that the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection [21, 67]. It is thus tempting to speculate that expressing ITGA7 on the surface of exosomes might permit specific targeting of the skeletal muscle for delivering either miRNAs or siRNAs.

## **Conclusions**

It is well-known that SkM is an endocrine organ which through secretion of hormone-like factors may influence metabolism in tissues and organs [26-28]. Until now, myokines from the muscle cell secretome provided a conceptual basis to explain how muscles communicate with other organs [68]. In this study, we demonstrated for the first time that SkM secreted exosomes, which contain specific and transferable miRNAs, can act as 'endocrine-like' signals. Previous studies on

cancer cells have shown that exosomal miRNA expression profiles have signatures related to tumor classification, diagnosis, and disease progression [69]. It is thus tempting to speculate that during insulin-resistance, or other metabolic disorders affecting muscle physiology, SkM would release a new class of exosomes containing specific populations of miRNAs, different to those in normal muscle cells, which could modify the inter-cellular message between SkM and other tissues, or could locally amplify the disease. Additional studies are now required to demonstrate the role of exosome miRNAs in muscular pathologies.

## Methods

*C2C12 culture conditions*- C2C12 mouse myoblasts were maintained in DMEM (4.5g/l glucose) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1000 UI/ml penicillin, 1000 UI/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at 37°C in humidified air containing 5% CO<sub>2</sub>. Differentiation was induced with 2% horse Serum (HS). FBS and HS were depleted of their exosomes by centrifugation at 110,00g overnight at 4°C. The supernatant was passed through a 0.22 µm filter and diluted with sterile DMEM. The exosome-depleted serum was used to grow the cells when conditioned media were collected for exosome purification.

*Isolation of myoblasts and myotubes exosomes*- Exosomes were purified from 200ml of the C2C12 myoblast or myotube conditioned media. Briefly, cell debris and organelles were eliminated at 2,000g for 20min and at 10,000g for 30 min. The resulting supernatant was filtered through a 0.22 µm filter. Exosomes were pelleted by ultracentrifugation at 100,000g for 70min +4°C (Beckman-Coulter, Optima<sup>™</sup> L-80-XP ultracentrifuge, type 50-2Ti rotor). The nanovesicle pellet was washed with 25ml of cold PBS in order to minimize sticking and trapping of non-exosome materials and resuspended in 50µl PBS. Exosome sizes and morphologies were verified by negative coloration using a JEM Jeol 1400 transmission electron microscope (Tokyo, Japan) equipped with a Orius 600 camera (USA).

*Total RNA extraction from C2C12 cells and exosomes*- Total RNA was extracted from either C2C12 myoblasts and myotubes or exosomes, in triplicate, by using TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, France). RNA was quantified with a NanoDrop spectrophotometer (Labtech, France).

*qRT-PCR*- Real-time RT-PCR was performed using ABsolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Abgene, Courtaboeuf, France) with a Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science, Paris, France). ITGA7 primers were purchased from Qiagen (Quantitect Primer Assay, QT10003135), and SIRT1 primers were S-GATAAGACGTCATCTTCAGAG and AS-TGAGAAAATGCTGGCCTAATA. Results were normalised with the gene encoding HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) (S-AGTTGAGAGATCATCTCCA and AS-TTGCTGACCTGCTGGATTAC). Data are expressed as mean±SEM. miR-133a and

miR-145 were quantified by using TaqMan®miRNA Assays (LifeTechnologies). Comparisons were analysed using Student's *t* test. Significance was defined as  $p \leq 0.05$ .

*Transmission Electron Microscopy (TEM)*- Exosomes in PBS were adsorbed on 200 Mesh nickel grids coated with formar-C. Immunogold labelling was performed by floatation of grids on drops of reactive media. Non-specific sites were coated with 1% BSA in 50 mM Tris<sup>®</sup> HCL, pH 7.4 for 10 min at RT. Antibody incubation was carried out for 4 hours at 4°C in a wet chamber with mouse monoclonal antibody raised against CD63 (sc-15363) (Santa Cruz Biotechnology) (dilution 1/50) in 1%BSA, 50 mM Tris<sup>®</sup> HCL, pH 7.4. Grids were successively washed once in 50mM Tris<sup>®</sup> HCL, pH 7.4 and pH 8.2 at RT. They were then preincubated with 1% BSA in 50 mM Tris<sup>®</sup> HCL, pH 8.2 for 10 min at RT and labelled with a goat anti mouse IgG gold-conjugated 10 nm, (Tebu bio, France) diluted 1/80 in 1% BSA , 50mM Tris<sup>®</sup> HCL, pH 8.2 in a wet chamber for 45 min. Grids were successively washed once in 50 mM Tris<sup>®</sup> HCL, pH 8.2 and pH 7.4 and in filtrated distilled water at RT. Finally, grids with suspensions were colored with 2% phosphotunstic acid for 2 min and examined using a JEM Jeol 1400 transmission electron microscope (Tokyo, Japan) equipped with an Orius 600 camera (USA).

*Quantification of mature miRNAs*- Expression of mature miRNAs was measured in triplicate by using the TaqMan® Low Density Arrays V2 (57) with Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR system. Briefly, 100 ng of total RNA were used for each multiplex reverse transcription (RT). Each RT reaction was diluted 62.5 fold and mixed with 50µl TaqMan Universal PCR Master mix (2X). The 100µl were loaded into the corresponding fill port. Individual singleplex PCR reactions were performed in 384-well reaction plates with Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR system. The level of miRNA expression was measured using Ct (threshold cycle) determined by RQ Manager. Included on each array were 3 TaqMan miRNA endogenous controls, and one Taqman miRNA assay not related to rodent.

*Endogenous silencing of Itga7*: Endogenous silencing of Itga7 in C2C12 was carried out using siRNA (#SI02733290, Qiagen) to transfect differentiated myotubes for 36h. In parallel, transfections were realized with negative control siRNAs which had no

homology to any known mammalian gene (AllStars Negative Controls # 1027280, Qiagen) to pinpoint the effects of Itga7 knockdown. After transfection, the medium was changed and conditioned medium from C2C12 myotubes was collected after 48h. Decreased Itga7 expression was validated at the mRNA level by qRT-PCR (primers QT00136990 from QIAGEN) and at the protein level by Western-blot (ITA7 (sc-50431) and TSG101 (sc-6037) antibodies from Santa Cruz Biotechnology) (see supplementary figure 1).

*Transfection assay:* C2C12 myoblasts were plated on 6-well plates in the presence of exosomes from either myoblasts or myotubes. At 80% confluence, C2C12 were further transfected with 1 µg of pEZX-MT01 vector containing the full length 3'-UTR segment of Sirt1 (Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1) (GeneCopoeia, LabOmics, Belgium, clone MmiT032125-MT01). At confluence, transfected C2C12 myoblasts were incubated in differentiation medium for 48h. Then activities of firefly (*Photinus pyralis*) and Renilla (*Renilla reniformis*) luciferases were measured sequentially from each cell lysate by using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, #E1910). Firefly luciferase activities were normalized with Renilla luciferase activities to minimize experimental variabilities caused by differences in cell viability or transfection efficiency.

*Overexpression of miRNAs in C2C12 :* C2C12 cells were plated on 6-well plates and infected for 48h with  $10^8$  particules/ml of recombinant adenoviruses expressing either GFP (control), pre-miR-133a-1 or pre-miR-1-1.

### **Authors' contributions**

AF is PhD student who participated in the design of the study and to the manuscript. SR conceived the study, and coordinated and helped to draft the manuscript. AJ, SP and VE are technicians who carried out western-blot analysis, TLDA and microRNA amplifications and *in-vitro* studies. EE carried out Transmission Electron Microscopy (TEM). HV and KC helped to draft the manuscript and gave constructive comments. EL participated in luciferase assay analysis. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Association Française de recherche sur les Myopathies (AFM), Association Française de Diabétologie (SDF) and INRA specific grant (ANSSD).

## Figure Legends

Figure 1: Characterization of nanovesicles isolated from C2C12 myoblast- and myotube-conditioned medium. **A**\_Transmission electron microscopic images of purified secreted nanovesicles from myoblasts or myotubes. Bar=500nm. **B**\_These vesicles were labelled with anti-CD63 gold particles to confirm that they expressed this exosomal protein at their membranes.

Figure 2: Venn diagrams showing miRNA profile overlaps between C2C12 myoblasts and myotubes, and exosomes. miRNAs commonly detected in C2C12 myoblasts or myotubes are indicated in bold.

Figure 3 : miRNAs regulations in C2C12 cells and in secreted exosomes during differentiation.

Figure 4 : KEGG pathways significantly enriched in target genes for up-regulated miRNAs (blue) or down-regulated miRNAs (yellow) in exosomes from C2C12 muscle cells during differentiation. Only pathways containing at least 10 genes are considered. Hierarchical clustering groups the miRNAs according to their fold changes during myogenesis (expression in myotubes vs expression in myoblasts : MT/MB). Three independent preparations of exosomes were analysed.

Figure 5 : Exosomes from myotubes can transfer small RNAs in proliferating myoblasts. **A**\_Quantification of miR-133a and miR-145, in C2C12 myoblasts incubated either with exosomes from myoblasts (EXO-MB) or exosomes from myotubes (EXO-MT). **B**\_Levels of Itga7 mRNA in C2C12 myoblasts, treated for 48h with exosomes from myotubes which had been transfected with siRNA against Itga7, siRNA control, or with control exosomes from untransfected myotubes. Data are expressed as mean±SEM. Results were normalised with the gene encoding HPRT used as the reference. Comparisons were analysed using Student's *t*-test. Significance was defined as *p* value of ≤0.05.

Figure 6: Myotube-exosome miRNAs can silence Sirtuin1 in proliferating myoblasts. **A**\_SIRT1 and TUBα (tubulin alpha) protein detection during C2C12 differentiation



(from 0 to 48h post-induction). **B\_**mRNA level of Sirt1 during C2C12 differentiation (from 0 to 48h post-induction). Data are expressed as mean±SEM. Results were normalised with the gene encoding HPRT used as the reference. **C\_**Summary of the protocols used to transfect proliferating C2C12 myoblasts with a plasmid containing the Sirt1 3'-UTR region. Previously, cells had been incubated either with exosomes from myoblasts or myotubes at the beginning of proliferation. **D\_**Sirt1 relative luciferase activity in C2C12 cells, 48h after induction of differentiation. **E\_**Western-blot analysis of SIRT1 and ACTIN protein expressions in C2C12 myotubes, 48h after induction of differentiation. **F\_**mRNA level of Sirt1 48h after induction of differentiation. Previously, cells had been incubated with exosomes from either myoblasts or myotubes at the beginning of proliferation. **G\_**mRNA level of Sirt1 transfected with adenovirus expressing mature miR-133a or miR-1, or GFP as control.

EXO-MB : myoblast-secreted exosomes, EXO-MT : myotube-secreted exosomes. Comparisons were analysed using Student's *t*-test. Significance was defined as *p* value of  $\leq 0.05$  (\*)

Supplementary data 1 : **A\_** Endogenous silencing of ITGA7 in differentiated C2C12 cells was validated by western-blot. ITGA7 was concomitantly down-regulated in exosomes. We controlled the expression of an exosomal marker (TSG101) to validate that siRNA overexpression did not reduce exosome synthesis. **B\_** mRNA level of ITGA7 was reduced in myoblasts incubated with exosomes from myotubes isolated from cells treated with siRNA against ITGA7. In contrast mRNA levels of VPS4 and TG101, two genes involved in exosome formation, were not affected, indicating that ITGA7 expression in myoblasts was specifically altered by exosomes isolated from siRNA-treated myotubes.

## REFERENCES

1. Lee RC, Ambros V: **An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*.** *Science* 2001, **294**:862-864.
2. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T: **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.** *Science* 2001, **294**:853-858.
3. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**:281-297.
4. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP: **Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels.** *Nature* 2011, **466**:835-840.
5. Treiber T, Treiber N, Meister G: **Regulation of microRNA biogenesis and function.** *Thromb Haemost* 2012, **107**:605-610.
6. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB: **Prediction of mammalian microRNA targets.** *Cell* 2003, **115**:787-798.
7. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ: **Dicer is essential for mouse development.** *Nat Genet* 2003, **35**:215-217.
8. Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP: **MicroRNAs: molecular features and role in cancer.** *Front Biosci* 2012, **17**:2508-2540.
9. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D: **microRNA regulation of inflammatory responses.** *Annu Rev Immunol* 2011, **30**:295-312.
10. Salta E, De Strooper B: **Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders.** *Lancet Neurol* 2012, **11**:189-200.
11. Lorenzen J, Kumarswamy R, Dangwal S, Thum T: **MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications.** *RNA Biol* 2010, **9**.
12. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K: **The microRNA spectrum in 12 body fluids.** *Clin Chem* 2010, **56**:1733-1741.
13. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, et al: **Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:5003-5008.
14. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J: **Shedding microvesicles: artefacts no more.** *Trends Cell Biol* 2009, **19**:43-51.
15. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, et al: **Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection.** *Sci Signal* 2009, **2**:ra81.
16. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B: **Characterization of extracellular circulating microRNA.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:7223-7233.
17. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S: **Exosomes: composition, biogenesis and function.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:569-579.
18. Scita G, Di Fiore PP: **The endocytic matrix.** *Nature* 2010, **463**:464-473.
19. Hurley JH, Odorizzi G: **Get on the exosome bus with ALIX.** *Nat Cell Biol* 2012, **14**:654-655.
20. Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M: **Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection.** *Int J Biochem Cell Biol* 2012.
21. Rana S, Zoller M: **Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis.** *Biochem Soc Trans* 2011, **39**:559-562.
22. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**:654-659.

23. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO: **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:1470-1476.
24. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, de Paz N, Dooner MS, Puente N, Ayala C, Brilliant K, Berz D, Lee D, et al: **Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription.** *Exp Hematol* 2010, **38**:233-245.
25. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, de Paz N, Dooner MS, Puente N, Ayala C, Brilliant K, Berz D, Lee D, et al: **Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription.** *Exp Hematol*, **38**:233-245.
26. Bouzakri K, Plomgaard P, Berney T, Donath MY, Pedersen BK, Halban PA: **Bimodal effect on pancreatic beta-cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle.** *Diabetes* 2011, **60**:1111-1121.
27. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK: **IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth.** *Cell* 2003, **113**:483-494.
28. Haugen F, Norheim F, Lian H, Wensaas AJ, Dueland S, Berg O, Funderud A, Skalhegg BS, Raastad T, Drevon CA: **IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2010, **298**:C807-816.
29. Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Gioacchini AM, Tibollo P, Battistelli M, Falcieri E, Battistin L, Agnati LF, Stocchi V: **C2C12 myoblasts release microvesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction.** *Exp Cell Res* 2010, **316**:1977-1984.
30. Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, Min WP: **Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis.** *Blood Cells Mol Dis* 2005, **35**:169-173.
31. Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, Zhang L, Li C, Cong Y, Kimberly R, Grizzle WE, et al: **Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells.** *J Immunol* 2007, **178**:6867-6875.
32. Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V: **Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state.** *Mol Cell* 2003, **12**:51-62.
33. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S: **Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles.** *J Immunol* 2001, **166**:7309-7318.
34. Deo A, Carlsson J, Lindlof A: **How to choose a normalization strategy for miRNA quantitative real-time (qPCR) arrays.** *J Bioinform Comput Biol* 2011, **9**:795-812.
35. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, et al: **Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes.** *Blood* 2012, **119**:756-766.
36. Ge Y, Chen J: **MicroRNAs in skeletal myogenesis.** *Cell Cycle* 2011, **10**:441-448.
37. Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D: **MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease.** *Int J Biochem Cell Biol* 2011, **42**:1252-1255.
38. Cardinali B, Castellani L, Fasanaro P, Basso A, Alema S, Martelli F, Falcone G: **Microrna-221 and microrna-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells.** *PLoS One* 2009, **4**:e7607.

39. Hamrick MW, Herberg S, Arounleut P, He HZ, Shiver A, Qi RQ, Zhou L, Isales CM, Mi QS: **The adipokine leptin increases skeletal muscle mass and significantly alters skeletal muscle miRNA expression profile in aged mice.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **400**:379-383.
40. Albinsson S, Suarez Y, Skoura A, Offermanns S, Miano JM, Sessa WC: **MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**:1118-1126.
41. Koutsoulidou A, Mastroiannopoulos NP, Furling D, Uney JB, Phylactou LA: **Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle.** *BMC Dev Biol* 2011, **11**:34.
42. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ: **The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.** *Nat Genet* 2006, **38**:228-233.
43. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ: **Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:341-345.
44. Liu J, Burkin DJ, Kaufman SJ: **Increasing alpha 7 beta 1-integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, **294**:C627-640.
45. Granjon A, Gustin MP, Rieusset J, Lefai E, Meugnier E, Guller I, Cerutti C, Paultre C, Disse E, Rabasa-Lhoret R, et al: **The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway.** *Diabetes* 2009, **58**:2555-2564.
46. Rathbone CR, Booth FW, Lees SJ: **Sirt1 increases skeletal muscle precursor cell proliferation.** *Eur J Cell Biol* 2009, **88**:35-44.
47. Saini A, Al-Shanti N, Sharples AP, Stewart CE: **Sirtuin 1 regulates skeletal myoblast survival and enhances differentiation in the presence of resveratrol.** *Exp Physiol* 2011, **97**:400-418.
48. Yamakuchi M: **MicroRNA Regulation of SIRT1.** *Front Physiol* 2012, **3**:68.
49. Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, Lidov HG, Kang PB, North KN, Mitrani-Rosenbaum S, et al: **Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:17016-17021.
50. Gagan J, Dey BK, Layer R, Yan Z, Dutta A: **MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation.** *J Biol Chem* 2011, **286**:19431-19438.
51. Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A: **The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**:278-284.
52. Panguluri SK, Bhatnagar S, Kumar A, McCarthy JJ, Srivastava AK, Cooper NG, Lundy RF, Kumar A: **Genomic profiling of messenger RNAs and microRNAs reveals potential mechanisms of TWEAK-induced skeletal muscle wasting in mice.** *PLoS One* 2010, **5**:e8760.
53. Sun Q, Zhang Y, Yang G, Chen X, Zhang Y, Cao G, Wang J, Sun Y, Zhang P, Fan M, et al: **Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:2690-2699.

54. Yu ML, Wang JF, Wang GK, You XH, Zhao XX, Jing Q, Qin YW: **Vascular smooth muscle cell proliferation is influenced by let-7d microRNA and its interaction with KRAS.** *Circ J* 2011, **75**:703-709.
55. Drummond MJ, McCarthy JJ, Sinha M, Spratt HM, Volpi E, Esser KA, Rasmussen BB: **Aging and microRNA expression in human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis.** *Physiol Genomics* 2011, **43**:595-603.
56. Tang H, Liu X, Wang Z, She X, Zeng X, Deng M, Liao Q, Guo X, Wang R, Li X, et al: **Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth.** *Brain Res* 2011, **1390**:21-32.
57. Xu D, He XX, Chang Y, Sun SZ, Xu CR, Lin JS: **Downregulation of MiR-93 Expression Reduces Cell Proliferation and Clonogenicity of HepG2 Cells.** *Hepatogastroenterology* 2012, **59**.
58. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F: **Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells.** *Nat Commun* 2011, **2**:282.
59. Katakowski M, Buller B, Wang X, Rogers T, Chopp M: **Functional microRNA is transferred between glioma cells.** *Cancer Res* 2010, **70**:8259-8263.
60. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T: **Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells.** *J Biol Chem* 2011, **285**:17442-17452.
61. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O: **Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**:1143-1149.
62. Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, Lazar I, Bertrand-Michel J, Roques V, Balor S, Terce F, Lopez A, Salome L, Joly E: **Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation.** *J Biol Chem* 2011, **286**:34426-34439.
63. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T: **Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells.** *J Biol Chem* 2010, **285**:17442-17452.
64. Tanaka S, Terada K, Nohno T: **Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells.** *J Mol Signal* 2011, **6**:12.
65. Anton R, Chatterjee SS, Simundza J, Cowin P, Dasgupta R: **A systematic screen for micro-RNAs regulating the canonical Wnt pathway.** *PLoS One* 2011, **6**:e26257.
66. Ryall JG: **The role of sirtuins in the regulation of metabolic homeostasis in skeletal muscle.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012, **15**:561-566.
67. Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M: **Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection.** *Int J Biochem Cell Biol* 2012, **44**:1574-1584.
68. Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, Yahagi N, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, et al: **The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **385**:492-496.
69. Taylor DD, Gercel-Taylor C: **MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer.** *Gynecol Oncol* 2008, **110**:13-21.

**Figure 1**

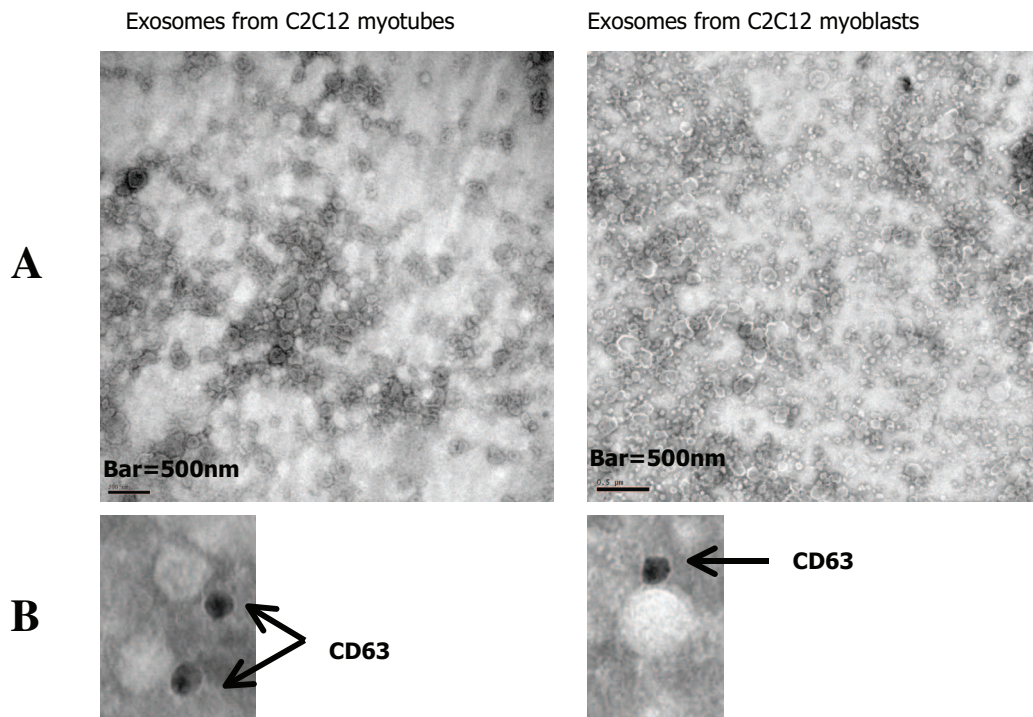
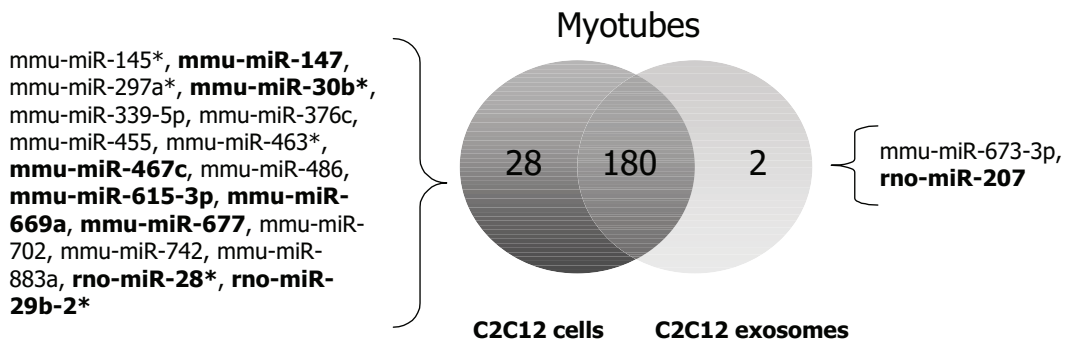
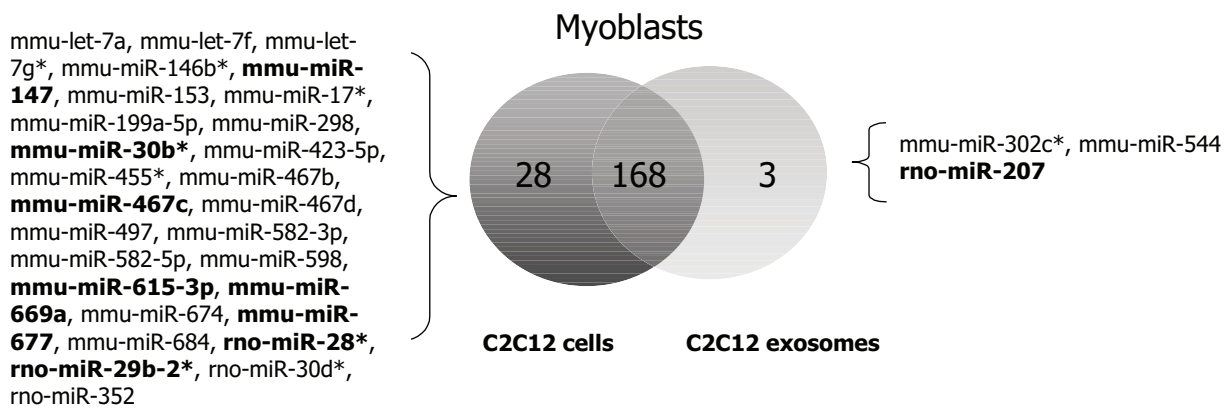


Figure 2



**FIGURE 3**

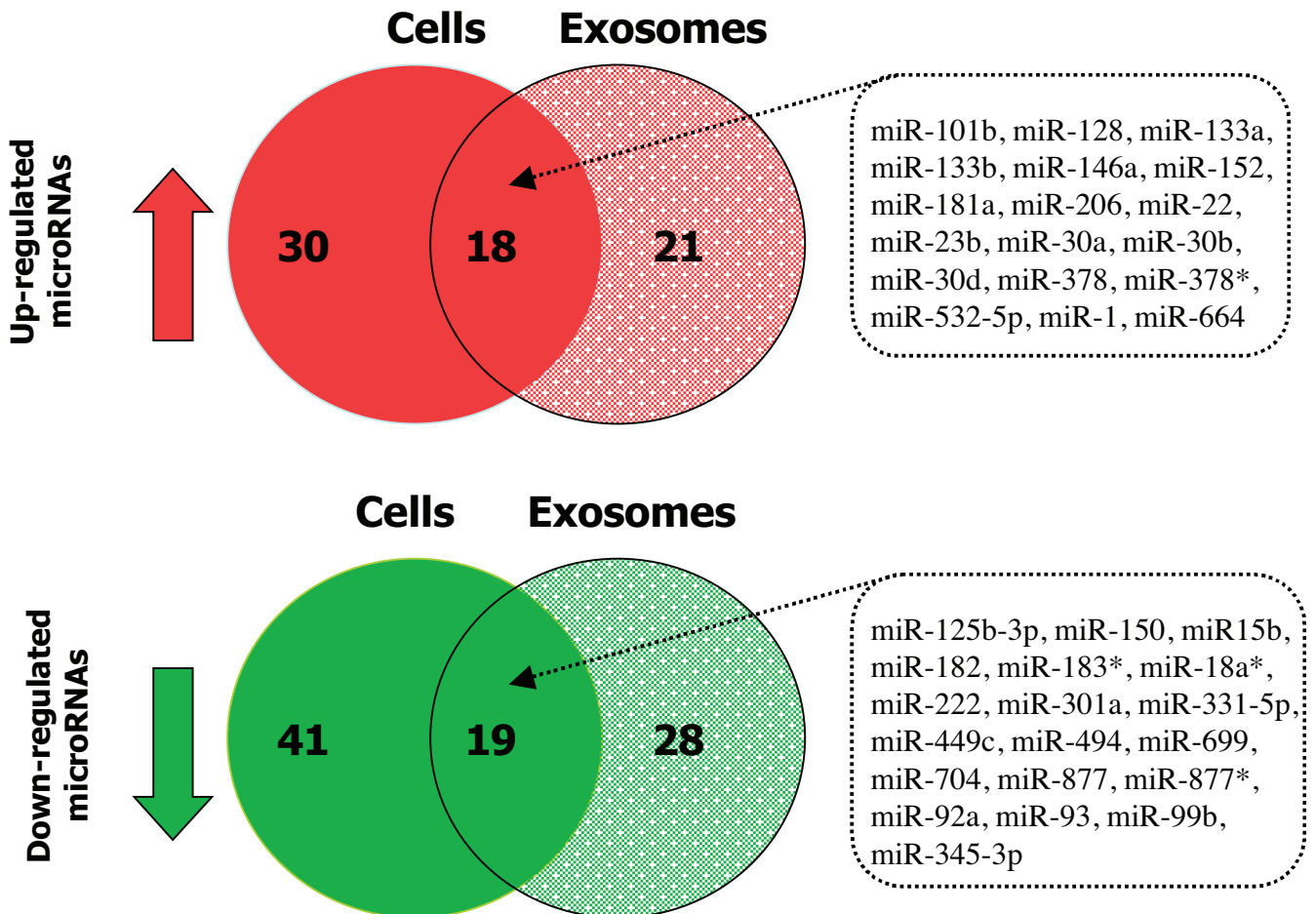
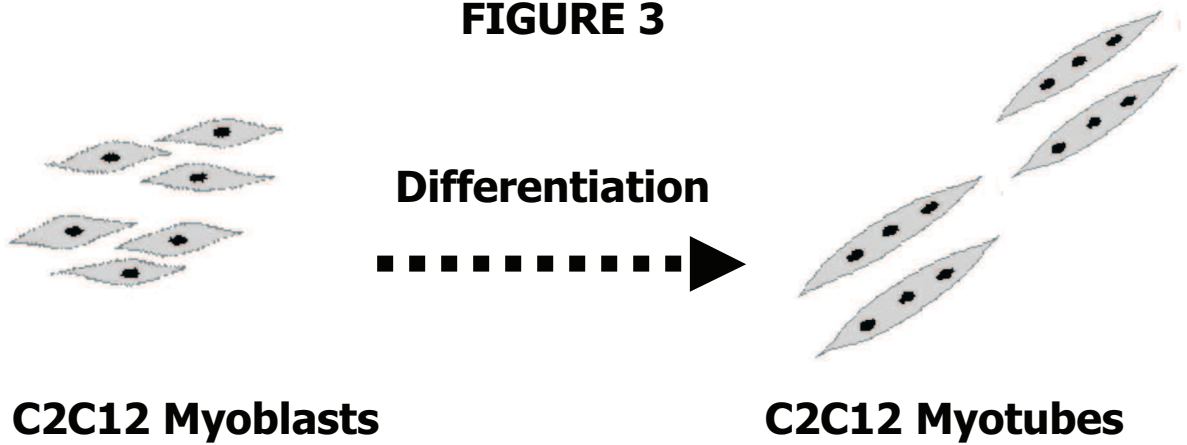
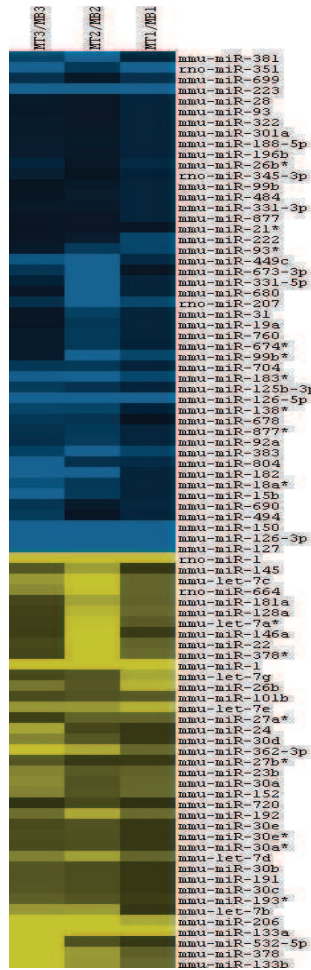




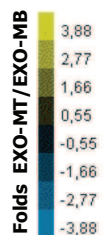
Figure 4



KEGG pathways	p-values
Wnt signaling pathway	1,91E-10
Insulin signaling pathway	3,75E-10
Hedgehog signaling pathway	1,18E-08
Axon guidance	2,24E-08
Glycosphingolipid biosynthesis	7,70E-07
Endocytosis	4,46E-06
Oocyte meiosis	4,79E-06
Regulation of actin cytoskeleton	1,28E-05
Adipocytokine signaling pathway	2,01E-05
MAPK signaling pathway	2,05E-05
Phosphatidylinositol signaling system	2,61E-05
GnRH signaling pathway	3,42E-05
Fc gamma R-mediated phagocytosis	3,69E-05
Ubiquitin mediated proteolysis	5,95E-05
mTOR signaling pathway	8,54E-05
Fc epsilon RI signaling pathway	9,57E-05
Purine metabolism	9,66E-05
Neurotrophin signaling pathway	1,50E-04
Glycerophospholipid metabolism	1,77E-04
Inositol phosphate metabolism	1,87E-04
Tight junction	2,78E-04
Focal adhesion	4,39E-04
VEGF signaling pathway	5,55E-04
TGF-beta signaling pathway	9,43E-04
ErbB signaling pathway	2,77E-03
Notch signaling pathway	3,24E-03
Vascular smooth muscle contraction	3,44E-03
p53 signaling pathway	3,56E-03



KEGG pathways	p-values
Glycosaminoglycan biosynthesis	2,59E-06
Adherens junction	1,23E-05
MAPK signaling pathway	3,48E-05
Tight junction	3,76E-05
Axon guidance	8,40E-05
Calcium signaling pathway	2,36E-04
Ubiquitin mediated proteolysis	2,47E-04
Glycerophospholipid metabolism	3,46E-04
Focal adhesion	3,82E-04
VEGF signaling pathway	4,47E-04
Sphingolipid metabolism	5,26E-04
Apoptosis	5,39E-04
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	6,73E-04
Lysosome	7,37E-04
ErbB signaling pathway	7,55E-04
Endocytosis	9,53E-04
Wnt signaling pathway	1,14E-03
Arginine and proline metabolism	1,74E-03
Neurotrophin signaling pathway	2,24E-03
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	2,35E-03
Spliceosome	2,49E-03
Jak-STAT signaling pathway	2,77E-03
Vascular smooth muscle contraction	3,51E-03
T cell receptor signaling pathway	4,30E-03
Type II diabetes mellitus	5,77E-03
Neuroactive ligand-receptor interaction	5,81E-03
Adipocytokine signaling pathway	9,06E-03
ECM-receptor interaction	1,08E-02
GnRH signaling pathway	1,35E-02
Gap junction	1,56E-02



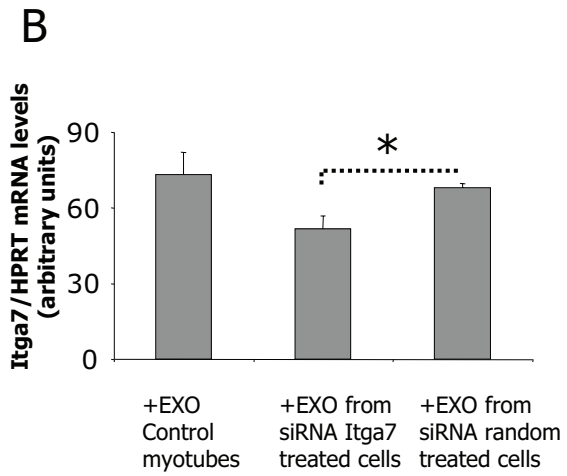
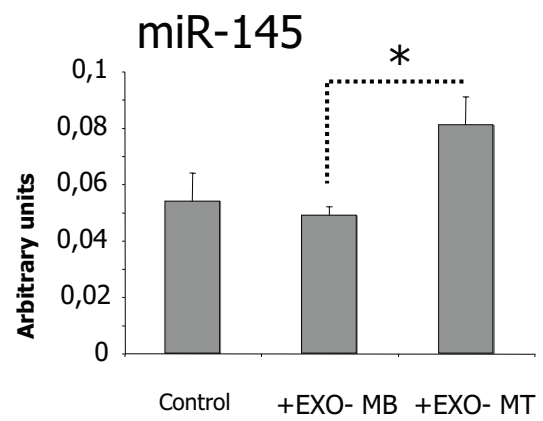
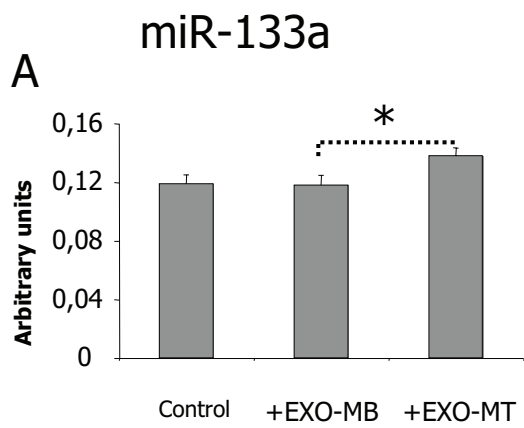


Figure 5

Figure 6

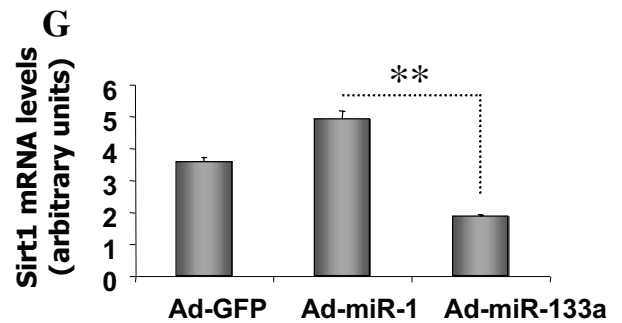
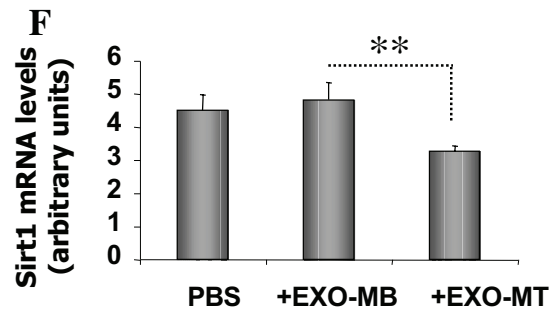
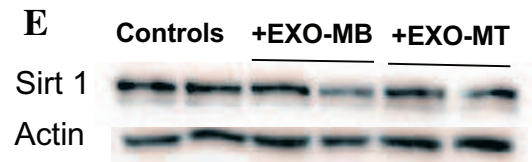
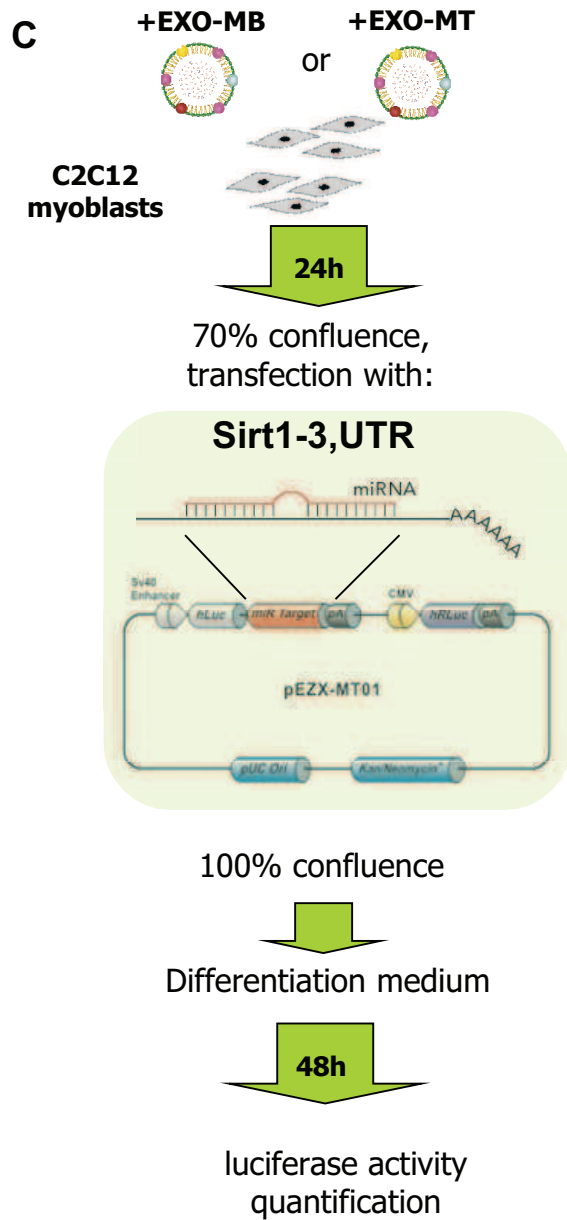
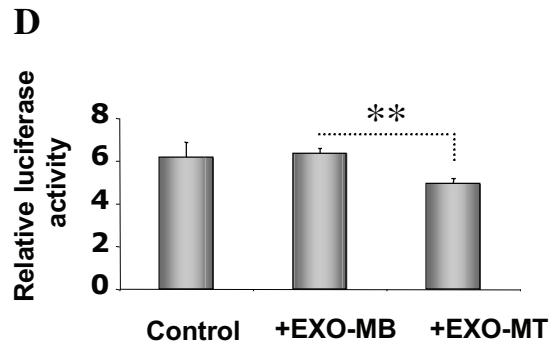
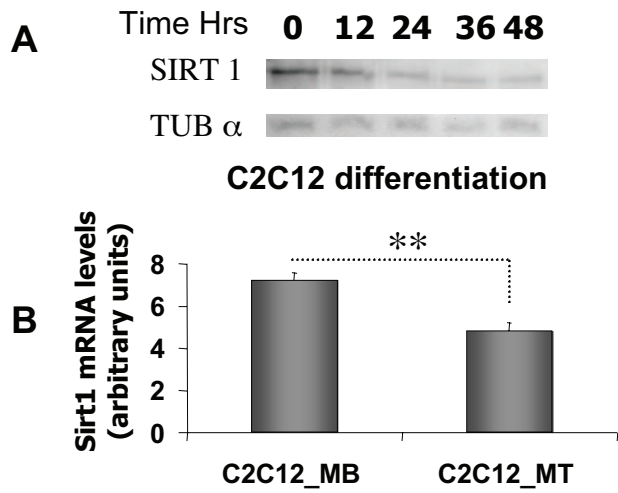


Table 1: Subsets of microRNAs significantly enriched in exosomes from C2C12 myoblasts and myotubes. MicroRNAs found both in myoblast- and myotube-secreted exosomes are indicated in bold

	<i>p</i> -values (Student t- test)	Mean Ct values (myoblasts)	SEM	Mean Ct values (exosomes)	SEM
<b>MYOBLASTS</b>					
<b>mmu-miR-150</b>	0,01111397	29,73193666	0,32636	24,65900316	0,75094
<b>mmu-miR-21*</b>	0,00315996	31,45101495	0,17763	28,63471707	0,30466
mmu-miR-223	0,00553208	33,44534316	0,70878	24,01019832	1,2224
mmu-miR-33*	0,0136745	30,08233222	0,46367	27,52414449	0,34566
<b>mmu-miR-342-3p</b>	0,02606594	25,62269942	0,27824	23,57483118	0,45482
mmu-miR-381	0,0216345	38,26858737	1,51705	31,01236264	0,96933
mmu-miR-383	0,01469653	34,93504206	0,54154	29,48879672	0,97123
mmu-miR-410	0,00508886	37,90206606	0,57847	32,34523645	0,74898
<b>mmu-miR-449c</b>	0,04544337	30,83007554	0,83238	27,55928078	0,31175
mmu-miR-465b-5p	0,00709163	34,18456346	0,37332	29,13328903	0,69173
<b>mmu-miR-467b*</b>	0,01156921	30,84043766	0,33331	27,193937	0,59803
<b>mmu-miR-678</b>	0,02286224	29,32265947	0,16368	25,74720764	0,62098
<b>mmu-miR-704</b>	0,00022615	30,62445365	0,26128	24,2145301	0,35648
mmu-miR-709	0,04501476	17,71281376	0,29611	16,47453443	0,31115
mmu-miR-720	0,02901516	20,71683271	0,4054	18,75519085	0,42565
mmu-miR-760	0,04061276	25,86087273	0,43337	24,18342402	0,33261
<b>mmu-miR-764-5p</b>	0,01131494	30,30920238	0,1246	24,98703855	0,6294
<b>mmu-miR-801</b>	0,04718148	28,11289774	0,13548	20,87447695	1,64649
<b>mmu-miR-804</b>	0,01009687	35,08541503	0,15569	28,90762803	0,70698
<b>mmu-miR-877*</b>	0,00238101	25,28199433	0,29944	22,07136867	0,34774
mmu-miR-99b*	0,01373419	27,48045854	0,31252	25,50626224	0,3473
<b>rno-miR-345-3p</b>	0,0119035	30,80464758	0,3073	28,4669534	0,40575
rno-miR-664	0,00436716	25,94429283	0,14903	24,53249387	0,18185
	<i>p</i> -values (Student t- test)	Mean Ct values (myoblasts)	SEM	Mean Ct values (exosomes)	SEM
<b>MYOTUBES</b>					
<b>mmu-miR-150</b>	0,00381949	30,91098081	0,33837	26,82331952	0,10481
mmu-miR-181a-1*	0,02336187	29,00600754	0,37331	26,81617704	0,08372
mmu-miR-183*	0,02628997	26,85614034	0,29741	25,48941596	0,25706
mmu-miR-18a*	0,0087759	30,06166625	0,47057	27,07580574	0,38219
mmu-miR-191*	0,01364324	31,88898231	0,36891	28,68912039	0,57353
<b>mmu-miR-21*</b>	0,00654415	30,09696332	0,39402	27,37946101	0,29787
<b>mmu-miR-342-3p</b>	0,01825107	25,16238333	0,04015	22,53062992	0,37009
<b>mmu-miR-449c</b>	0,01157386	32,22083304	0,38166	27,88304309	0,70514
<b>mmu-miR-467b*</b>	0,00278106	30,16823336	0,3959	26,54188023	0,38422
mmu-miR-542-3p	0,02170116	29,07343157	0,3242	31,37939037	0,48435
<b>mmu-miR-678</b>	0,03636432	28,67922568	0,73793	25,25732209	0,81617
<b>mmu-miR-704</b>	0,0022794	30,44075651	0,67965	24,06070021	0,50225
mmu-miR-706	0,00065083	25,81463724	0,31413	19,51522158	0,13268
<b>mmu-miR-764-5p</b>	0,00173685	28,96795599	0,37713	24,09059206	0,48501
<b>mmu-miR-801</b>	0,0003992	28,5899812	0,33538	21,55200503	0,45802
<b>mmu-miR-804</b>	0,00312153	34,22378442	0,40665	28,9506762	0,60225
<b>mmu-miR-877*</b>	0,01438495	25,16743308	0,58258	21,99930054	0,44677
mmu-miR-878-5p	0,02192809	33,40739242	0,44101	30,84035108	0,5329
<b>rno-miR-345-3p</b>	0,00566844	30,53389364	0,06269	27,44359074	0,27346
rno-miR-463	0,0469897	31,88116981	0,53747	26,81581981	1,32662

Table 2: List of the 20 genes targeted by at least 6 microRNA, up- or down-regulated during C2C12 myoblast differentiation. Target genes were determined by using TargetScan 6.0

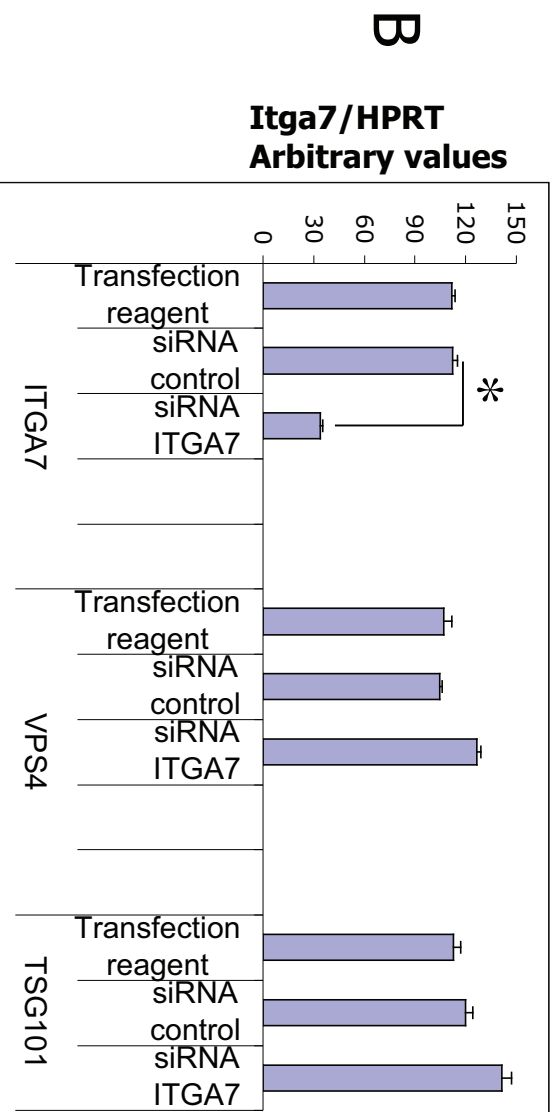
Target genes of down-regulated microRNAs	number of microRNA binding site in 3'-UTR	Name
MYT1L	8	myelin transcription factor 1-like protein
FAT3	8	FAT tumor suppressor homolog 3
SPRY3	8	sprouty homolog 3
CACNB1	7	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit
FAM116A	7	family with sequence similarity 116, member A
KIF1B	7	kinesin family member 1B
TACC1	7	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
MYO1C	6	myosin IC
MTMR3	6	myotubularin related protein 3
RAPGEF5	6	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
PTPRE	6	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
C9orf69	6	chromosome 9 open reading frame 69
GTDC1	6	glycosyltransferase-like domain containing 1
FBXO10	6	F-box protein 10
FGF7	6	fibroblast growth factor 7
MAP2K1	6	mitogen-activated protein kinase kinase 1
SNTB2	6	syntrophin, beta 2
SMURF1	6	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1
WAC	6	WW domain containing adaptor with coiled-coil
WDR32	6	DDB1 and CUL4 associated factor 10

Target genes of up-regulated microRNAs	number of microRNA binding site in 3'-UTR	Name
RAB15	11	Ras-related protein Rab-15
GATM	11	glycine amidinotransferase
P4HA2	10	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II
MTX3	10	metaxin 3
PDP2	10	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2
PICALM	10	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
KREMEN1	10	kringle containing transmembrane protein 1
SURF4	10	surfeit 4
UBXD8	10	Fas associated factor family member 2
SCYL3	10	SCY1-like 3 (S. cerevisiae)
RFXDC1	10	regulatory factor X, 6
SLC30A4	10	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4
COL9A3	10	collagen, type IX, alpha 3
B3GAT1	10	beta-1,3-glucuronyltransferase 1
CASP3	10	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
MXD1	9	MAX dimerization protein 1
PDCD10	9	programmed cell death 10
HOXB4	9	homeobox B4
MAB21L1	9	mab-21-like 1 (C. elegans)
SIRT1	9	sirtuin 1

# Supplementary Figure 1

Myotube cell extract    Exosomes from myotubes



# DISCUSSION

Le premier chapitre de cette thèse a consisté à caractériser le contenu en protéines et en miARNs des exosomes sécrétés par les cellules musculaires murines C2C12, au cours de la myogenèse.

Dans un premier temps, la qualité et la pureté des échantillons obtenus ont du être vérifiées afin de confirmer l'obtention d'une population homogène d'exosomes pour les futures expérimentations. Ensuite, la caractérisation de la composition protéique et nucléique des exosomes sécrétés par les myoblastes et par les myotubes a pu être réalisée et comparée au contenu protéique et nucléique intrinsèque de la cellule au cours de la myogenèse. Enfin, une approche fonctionnelle mettant en jeu ces deux populations d'exosomes a été mise en place afin de déterminer un potentiel rôle biologique des exosomes au cours de la myogenèse.

## I Vérification de la qualité des exosomes isolés

### I.1 Utilisation d'un milieu de culture dépourvu en exosomes du sérum

Afin de récupérer uniquement les exosomes sécrétés par le type cellulaire étudié, il est nécessaire de s'affranchir des exosomes déjà présents dans les milieux de culture utilisés lors de la culture cellulaire. Présents dans les sérums de veau foetal (SVF) et de cheval (Horse Serum, HS) qui sont utilisés respectivement pour la prolifération des myoblastes et leur différenciation en myotubes, les milieux de culture ont été ultracentrifugés une nuit à 100.000g. Le surnageant récupéré a été filtré (Milieu Sans Exosomes, MSE, ou DED, DMEM Exosome-Depleted dans l'article 1) et utilisé pour la collecte des milieux conditionnés de myoblastes et de myotubes.

Toutefois, les myoblastes de la lignée C2C12 se différencient spontanément dès lors que les cellules sont confluentes. Afin d'éviter que la collecte des exosomes sécrétés par les myoblastes ne coïncide avec un début de programme de différenciation myogénique, les exosomes ont été isolés à partir des milieux de

culture de myoblastes dont la confluence était inférieure à 60%. A l'inverse des myoblastes, il n'y a pas de contraintes de culture pour les myotubes de la lignée C2C12 qui, une fois différenciés, se maintiennent plusieurs jours. C'est pourquoi, l'incubation des myotubes avec le milieu MSE correspondant a été réalisée une fois les cellules bien différenciées, soit 5 à 7 jours après l'initiation de la différenciation.

Etant donné que les milieux de culture utilisés ne contenaient plus les exosomes du sérum, il a fallu au préalable s'assurer que ces milieux ne perturbaient pas la prolifération des myoblastes et leur différenciation en myotubes. L'appareil mis au point par le groupe Roche, le « xCELLingence RTCA DP », a permis de s'assurer que le milieu MSE de prolifération ne perturbait pas la croissance des myoblastes. Cet appareil permet de suivre en temps réel l'occupation des puits par les cellules ensemencées grâce à l'évaluation de l'impédance fournie par les cellules, en réponse à une impulsion électrique régulière. La comparaison de l'évolution de l'occupation des puits par les cellules incubées dans le milieu classique de prolifération et celui sans les exosomes du sérum a permis d'établir que dans les deux cas les cellules se comportaient façon similaire.

Toutefois, étant donné que l'appareil ne mesure que l'impédance, on ne peut savoir si le signal est représentatif du nombre de cellules (prolifération cellulaire) ou s'il s'agit d'une augmentation de la taille des cellules. Une observation au microscope optique a permis dans un premier de temps de visualiser que la morphologie des cellules était identique, quel que soit le milieu de culture utilisé. Puis cette observation microscopique a été confirmée par l'utilisation du « Scepter 2.0 Handheld automated cell counter » (Millipore) qui a permis de déterminer que les myoblastes avaient la même taille, quel que soit le milieu de culture utilisé. Enfin, le temps de doublement des myoblastes a été calculé. Il en résulte qu'avec ces deux types de milieu de culture, les cellules se divisent toutes les 15 heures environ.

Concernant le milieu de culture dépourvu en exosomes de sérum de cheval pour la culture des myotubes, une observation au microscope optique a été réalisée et a permis de visualiser la présence de cellules plurinuclées, allongées et l'absence de mortalité cellulaire.



## **I.2 Isolement des exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes**

Après l'isolement des exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes à partir des milieux conditionnés respectifs, selon la méthode de centrifugations différentielles la plus décrite dans la littérature (Thery, Amigorena et al. 2006), il était nécessaire de s'assurer de la présence d'exosomes et de la qualité de la préparation. Le recours à trois techniques expérimentales a permis de considérer les vésicules extraites comme des exosomes.

Dans un premier temps, la granulométrie a permis de déterminer la distribution de tailles des nanovésicules sécrétées par les myoblastes et les myotubes. Dans les deux cas, la population est homogène (distribution en courbe de Gauss), dont la taille moyenne des vésicules est comprise entre 110 et 120 nanomètres, correspondant à la taille des exosomes étudiés et décrits dans différentes précédentes études (Thery, Boussac et al. 2001; Thery, Amigorena et al. 2006). La taille des nanovésicules a également été confirmée en microscopie électronique à transmission (Lamparski, Metha-Damani et al.). Cette technique expérimentale a également permis de déterminer que les vésicules isolées expriment les marqueurs protéiques membranaires (CD63) et luminal (Tsg101) caractéristiques des exosomes, par l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des billes d'or. Enfin, la technique de Western Blot a également permis d'établir un enrichissement des marqueurs protéiques caractéristiques des exosomes (CD63, CD81, Tsg101 et Alix) par rapport au contenu protéique de la cellule. Le Western Blot a également permis de confirmer la qualité des exosomes extraits : les marqueurs caractéristiques du réticulum endoplasmique (calnexine) et de la mitochondrie (les différentes sous unités du complexe OXPHOS) ne sont pas retrouvés dans les préparations.

De la même façon, la caractérisation du contenu protéique par spectrométrie de masse en tandem a, par la suite, confirmé l'origine endosomale des vésicules sécrétées et isolées par ultracentrifugation : parmi les protéines caractérisées dans les sécrétomes des myoblastes et des myotubes, 25 d'entre elles sont fréquemment retrouvées dans la liste des protéines contenues dans des exosomes isolés de différents types cellulaires (Mathivanan, Fahner et al. 2012).

Cependant, lors de l'analyse protéomique nous avons identifié 7 protéines de la famille des histones (Hist1h1c, Hist1h1d, Hist1h1b, Hist1h1e, Hist1h4a, Hist1h3b, Hist1h3a). La protéine Hist1h4a est la troisième protéine la plus abondante dans le listing des protéines identifiées dans les exosomes de myoblastes. Il est actuellement admis que les histones sont des marqueurs des corps apoptotiques (Thery, Ostrowski et al. 2009). Ceci suggère que malgré toutes les précautions prises, nous avons été contaminés, lors de l'isolement des exosomes, par d'autres types de vésicules. En effet, lors de la différenciation des myoblastes de la lignée C2C12, la sortie du cycle cellulaire est associée à une augmentation de la mortalité cellulaire (Thery, Amigorena et al. 2006). C'est pourquoi, les exosomes sécrétés par les myoblastes ont été isolés à partir de culture cellulaire dont la confluence n'excédait pas 70% de la surface d'ensemencement. La présence d'histones (isoformes H1 et H4) dans les préparations d'exosomes utilisant d'autres méthodes de purification a aussi été notifiée dans les publications de (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Mathivanan, Lim et al. 2010).

De la même manière, de nombreuses protéines retrouvées dans les exosomes sécrétés par les cellules musculaires, sont des composants de la matrice extracellulaire. Parmi ces protéines, on retrouve les collagènes (Col12a1 Col6a1 Col6a2), les protéoglycannes (hspg2, Sdc4, Ogn, Vcan), les métalloprotéinases (MMP2), les laminines (Lama5). Ces protéines, à *priori* non contenues dans les exosomes, auraient été précipitées en même temps que les exosomes lors des étapes d'ultracentrifugation, et n'auraient pas été éliminées lors de l'étape de lavage au PBS. Plusieurs publications suggèrent que d'autres techniques d'isolement des exosomes basées sur des centrifugations sur gradient/coussin de sucrose (densités égales à 1.20 g/ml) ou basées sur l'immuno-affinité, permettraient d'éliminer les protéines contaminantes (sérum, débris cellulaire et protéines de la membrane extracellulaire) des préparations (Ostrowski, Carmo et al. 2010; Atay, Gercel-Taylor et al. 2011). Cependant, il semblerait que ces techniques expérimentales ne soient pas non plus optimales pour l'isolement des exosomes et ne permettraient pas d'obtenir une meilleure pureté des préparations. En effet, les protéines de la matrice extracellulaire (Col12A1, Lama5, hspg2) et de la famille des histones sont également retrouvées dans les publications où les exosomes ont été isolés par des techniques d'immuno-affinité ou de centrifugations sur gradient de sucrose (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Mathivanan, Lim et al. 2010). De la même manière, en utilisant les

marqueurs CD63 et CD9, considérés spécifiques des exosomes, une population vésiculaire hétérogène en taille est isolée par immuno-affinité (Bobrie 2012). Le marqueur CD9 est également retrouvé à la membrane de grosses vésicules qui sont précipitées à de faibles vitesses de centrifugations (microparticules). De la même manière, des vésicules qui expriment le marqueur CD63 sont également retrouvées à des densités supérieures à 1.20 g/ml lors de l'isolation des exosomes sur gradient de sucrose. Ces résultats semblent indiquer que ces marqueurs protéiques ne puissent être considérés comme spécifiques des vésicules issues des endosomes et de nouvelles techniques sont nécessaires pour un isolement plus efficace des exosomes.

## **II Caractérisation du contenu des exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes**

### **II.1 Caractérisation du contenu protéique**

La liste des protéines contenues dans les exosomes de myoblastes et myotubes C2C12 a été obtenue par spectrophotométrie de masse. Respectivement, 318 et 375 protéines ont été identifiées dans les exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes. Parmi les différentes protéines identifiées, 244 protéines ont été retrouvées à la fois dans les 2 types d'exosomes. L'analyse de la fonction de ces protéines a permis de déterminer qu'elles étaient significativement impliquées dans la formation, le transport et la localisation intracellulaire des vésicules, des endosomes précoces et tardifs (plateforme intégrative Babelomics 4.0 (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>)). Etant donné que la biogenèse des exosomes est corrélée à la voie endosomale, ces observations confirment à nouveau que les nanovésicules sécrétées par les cellules musculaires au cours de la myogenèse sont majoritairement des exosomes.

Parmi les différentes protéines présentes dans les exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes, 23 protéines sont spécifiques du muscle. Cette donnée

suggère que le muscle strié squelettique sécrète des exosomes spécifiques qui contiennent, en plus des protéines caractéristiques des exosomes, des protéines spécifiques du tissu cellulaire qui les sécrète.

### **Liste des 23 protéines musculaires présentes dans les exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes**

ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1
ATP2A1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, fast twitch 1
ATP2A2	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2
CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma
CAPZB	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)
CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)
CRYAB	crystallin, alpha B
DAG1	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)
DES	desmin
FLNC	filamin C, gamma
ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
NES	nestin
RHOA	ras homolog family member A
SGCA	sarcoglycan, alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SGCD	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SNTB1	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1)
SNTB2	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 2)
TLN1	talin 1
TTN	titin
UTRN	utrophin
VCL	vinculin
VIM	vimentin

Respectivement 25 et 71 protéines n'ont été retrouvées que dans les exosomes de myoblastes ou de myotubes suggérant qu'elles auraient un rôle au cours de la myogenèse (Guescini, Guidolin et al. 2010). Parmi ces protéines, les protéines SGCA et DAG1 qui ont été identifiées uniquement dans les myotubes (Kislinger, Gramolini et al. 2005), sont également retrouvées uniquement dans les

exosomes des myotubes. Une analyse bioinformatique a permis de déterminer que les 71 protéines spécifiques des myotubes sont impliquées dans la contraction musculaire, et dans le transport des ions calcium nécessaires aux cellules musculaires différenciées.

L'étude des interactions protéine-protéine des tétraspanines et des intégrines à la surface membranaire des exosomes sécrétés au cours de la myogenèse (logiciel STRING 9.0, <http://string-db.org>), a permis de mettre en évidence une évolution de ce réseau protéique (décrit comme étant probablement impliqué dans la reconnaissance et la capture des exosomes) à la membrane des exosomes sécrétés par les cellules prolifératrices par rapport aux cellules différenciées (apparition des intégrines ITGB1, ITGB5 et de la tétraspanine TSPAN8 à la membrane des exosomes de myotubes). Cette réorganisation de l'architecture protéique à la membrane des exosomes durant la différenciation des myoblastes en myotubes pourrait participer à leur action biologique, tributaire de leur reconnaissance et capture par une cellule cible (Thery, Zitvogel et al. 2002; Rana and Zoller 2011; Rana, Yue et al. 2012). Dans ce sens, les exosomes sécrétés par les cellules musculaires de la lignée C2C12 expriment des marqueurs d'adhésion spécifiques (ITGB1, NCAM, CD9, CD81, CD44 et myoferline), impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion des myoblastes lors de leur fusion pour former les cellules musculaires différenciées (Gu, Wang et al. 1994; Charlton, Mohler et al. 2000; Schwander, Leu et al. 2003; Mylona, Jones et al. 2006; Grabowska, Szeliga et al. 2011; Posey, Pytel et al. 2011).

## **II.2 Caractérisation du contenu en acides nucléiques**

Comme le contenu protéique des exosomes varie selon que les exosomes sont sécrétés par les myoblastes ou les myotubes, et que les miARNs sont différentiellement exprimés et impliqués au cours de la myogenèse, nous avons émis l'hypothèse que le contenu exosomal en miARNs pourrait aussi varier au cours de la myogenèse. Les mêmes échantillons qui ont permis les analyses protéomiques, ont été utilisés pour la caractérisation de la composition en miARNs des exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes.

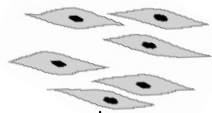
Les résultats obtenus ont permis de confirmer les données de la littérature : trois populations de miARNs sont observées selon qu'ils sont exportés ou non dans les exosomes et détectés ou non dans le cytoplasme de la cellule sécrétrice (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Skog, Wurdinger et al. 2008; Taylor and Gercel-Taylor 2008; Rabinowits, Gercel-Taylor et al. 2009; Kogure, Lin et al. 2011; Mittelbrunn, Gutierrez-Vazquez et al. 2011; Hu, Drescher et al. 2012; Kharaziha, Ceder et al. 2012).

La majorité des miARNs retrouvés dans les cellules musculaires sont exportés dans les exosomes. Sur les 196 miARNs détectés dans les myoblastes, 168 sont exportés via les exosomes (84%). Seuls 3 miARNs ne sont uniquement retrouvés que dans les exosomes (mmu-miR-302c\*, mmu-miR-544, rno-miR-207). 208 miARNs ont été identifiés dans les myotubes, dont 180 sont également retrouvés dans les exosomes sécrétés par la cellule (86%). Seuls 2 miARNs ne sont uniquement retrouvés que dans les exosomes sécrétés par les myotubes (mmu-miR-673-3p, rno-miR-207). Parmi les 28 miARNs qui ne sont jamais exportés dans les exosomes, 8 sont à la fois retrouvés dans le cytoplasme des myoblastes et des myotubes (miR-147, miR-30b\*, miR-467c, miR-615-3p, miR-669a, miR-677, miR-28\* and miR-29-2). Ces résultats, croisés aux données obtenues dans d'autres lignées cellulaires, permettent de confirmer que différentes classes de miARNs sont exprimées par les cellules, selon qu'ils soient exportés ou non (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Montecalvo, Larregina et al. 2012).

Parmi les miARNs identifiés dans les exosomes, 21 miARNs sont également retrouvés dans les exosomes quel que soit le type et le statut cellulaire (mastocytes et cellules dendritiques matures et immatures) (Valadi 2007, Montecalvo 2012). De la même manière, miR-147, miR-467c et miR-669a qui ne sont pas retrouvés dans les exosomes sécrétés par les cellules musculaires, ne sont jamais exportés dans les exosomes de cellules dendritiques. Ces résultats suggèrent que l'incorporation des miARNs dans les exosomes serait régulée, permettant de trier spécifiquement les miARNs destinés à l'export (Mittelbrunn 2011, Kosaka N. 2011).

Parmi tous les miARNs caractérisés, certains sont spécifiques du muscle (myomiR). Ils sont différenciellement exprimés au sein de la cellule au cours de la myogenèse, régulant ainsi la différenciation myogénique des cellules prolifératrices en cellules plurinuclées (Ge and Chen 2011). Lors de la différenciation des myoblastes en myotubes, 108 miARNs sont différemment exprimés au sein de la

### Myoblastes en prolifération



48h de prolifération dans un milieu dépourvu d'exosomes



**Filtration 0.22  $\mu\text{m}$  des milieux conditionnés récupérés**



Milieu conditionné complet

Milieu conditionné dépourvu en exosomes sécrétés



Exosomes sécrétés par les myoblastes

### Myotubes différenciés



48h de différenciation dans un milieu dépourvu d'exosomes



Milieu conditionné complet

Milieu conditionné dépourvu en exosomes sécrétés



Exosomes sécrétés par les myotubes

**Figure 30 Les trois fractions de milieux conditionnés des myoblastes et des myotubes utilisés**

cellule. 48 sont up-régulés ; parmi eux les myomiRs : miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, et 60 sont down-régulés. Dans un premier temps, cette expression différentielle cytoplasmique a été comparée à l'expression différentielle des miARNs exportés dans les exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes. La comparaison des miARNs présents dans les exosomes sécrétés par les cellules prolifératrices et différenciées a permis de mettre en évidence que 86 miARNs exportés sont différemment exprimés selon le statut physiologique de la cellule. Parmi les 39 miARNs up-régulés, 18 le sont également au sein de la cellule ; de même 19 miARNs sur 47 sont down-régulés à la fois dans les exosomes et dans les cellules. De façon intéressante let-7d est régulé à l'envers dans les exosomes par rapport au cytoplasme : up-régulé dans la cellule et down-régulé au sein des exosomes sécrétés.

### **III Caractérisation du rôle biologique des exosomes sécrétés au cours de la myogenèse**

Afin de déterminer si les exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes pouvaient avoir un rôle au cours de la myogenèse, nous avons fractionné les milieux conditionnés récupérés (milieu conditionné complet, milieu conditionné sans exosomes, ou uniquement les exosomes) (Figure 30).

#### **III.1 Les exosomes régulent la prolifération des myoblastes (résultats article 1)**

Afin de déterminer l'impact des différentes fractions de milieux conditionnés et des exosomes sur la prolifération des myoblastes de la lignée C2C12, le temps de doublement des cellules a été calculé. Le temps de doublement des myoblastes dans le milieu de culture 'frais' a servi de référence (temps de doublement de 15h). En présence des milieux conditionnés complets de myoblastes et de myotubes, le temps de doublement des cellules augmente indiquant que la prolifération des cellules est ralentie. La prolifération des myoblastes est encore plus ralentie, quand



les exosomes sécrétés par les myoblastes sont enlevés du milieu conditionné. A l'inverse, le temps de doublement des myoblastes n'est pas significativement augmenté quand les exosomes sécrétés par les myotubes sont enlevés du milieu conditionné. Ces résultats suggèrent que les exosomes sécrétés par les myoblastes participent à la régulation de la prolifération des myoblastes.

Afin d'étudier plus spécifiquement les effets des exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes sur la prolifération, les myoblastes ont été incubés en présence des exosomes isolés. En présence des exosomes sécrétés par les myotubes, le temps de doublement des cellules est significativement augmenté, suggérant que ces exosomes ont un effet anti-prolifération. A l'inverse, le temps de doublement des cellules n'est pas modifié quand les cellules sont cultivées en présence des exosomes sécrétés par les myoblastes.

Pour tenter de comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'effet des exosomes sécrétés par les myoblastes sur la croissance des cellules, nous avons quantifié l'expression de gène cycline D1 (CNND1) impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Sherr 1995). Le milieu conditionné où les exosomes sécrétés par les myoblastes ont été enlevés, est associé à une expression réduite de la cycline D1. La réduction de l'expression de ce gène n'est pas détectée lorsque les exosomes sécrétés par les myotubes sont retirés du milieu de culture conditionné. De plus, les myoblastes incubés en présence des exosomes libérés par les myotubes ont de faibles taux d'ARN messagers de la cycline D1, par rapport aux cellules incubées avec les exosomes libérés par les myoblastes. L'ensemble de ces résultats indique que les exosomes sécrétés par les myoblastes et les myotubes ont des effets antagonistes sur la prolifération des myoblastes.

### **III.2 Les exosomes sont impliqués dans la différenciation des myotubes**

Les résultats décrits précédemment indiquent que les exosomes sécrétés par les myoblastes participeraient à la prolifération cellulaire, alors que les exosomes sécrétés par les myotubes sembleraient plutôt ralentir voire bloquer la prolifération des cellules. Nous avons donc pensé que les exosomes des myotubes participeraient à l'induction de la différenciation des cellules musculaires.

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié l'expression de deux protéines importantes pour la différenciation des myotubes : la myogénine et Smad3. La myogénine est exprimée dès les premières étapes de la différenciation musculaire et est considérée comme un bon marqueur de la différenciation myogénique. En début de différenciation, la protéine Smad3 est également exprimée et permet l'arrêt du cycle cellulaire des myoblastes. (Ge, McFarlane et al. 2011). Nos résultats indiquent que l'expression de ces deux protéines est plus importante quand les myoblastes sont pré-incubés en présence des exosomes de myotubes, au cours de la prolifération. A l'inverse, les exosomes sécrétés par les myoblastes n'ont aucune incidence sur l'expression précoce de ces deux facteurs myogéniques. Ces données suggèrent que les exosomes sécrétés par les cellules musculaires différenciées permettraient d'initier la différenciation myogénique en stimulant l'expression des marqueurs musculaires précoces impliqués dans le processus de différenciation cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à savoir si les miARNs différenciellement exprimés pendant la myogenèse étaient impliqués dans l'action des exosomes. Pour cela, nous avons déterminé si les exosomes pouvaient transmettre ces miARNs et participer ainsi à la régulation de l'expression génique lors du processus de différenciation. Nous nous sommes focalisés sur les miARNs musculaires miR-133a et miR-145 qui sont principalement exprimés dans les myotubes et exportés dans les exosomes. L'expression de ces deux myomiRs est induite dès l'initiation de la différenciation myogénique, période durant laquelle ils ont un rôle important de régulateur de la différenciation et de la fonction musculaire (Albinsson, Suarez et al. 2010; Koutsoulidou, Mastroiannopoulos et al. 2011). L'incubation des myoblastes en présence des exosomes sécrétés par les myotubes a permis de mettre en évidence le transfert horizontal de ces deux miARNs (résultats articles 2).

Les exosomes peuvent promouvoir le transfert de siRNAs exogènes, semblables en longueur aux miARNs. L'utilisation des exosomes pour délivrer des siRNAs et des miARNs serait potentiellement mieux tolérée par le système immunitaire et permettrait également de cibler spécifiquement un tissu. Récemment, une publication a montré qu'il était possible de cibler la capture des exosomes sécrétés par les cellules dendritiques par le cerveau. Pour ce faire, les auteurs ont fait exprimer les protéines spécifiques pour la reconnaissance des cellules

neuronales, à la membrane des exosomes sécrétés (Alvarez-Erviti, Seow et al. 2011). Nous avons décidé d'utiliser les exosomes sécrétés par les myotubes comme véhicule pour des siARNs. L'intégrine  $\alpha 7$  (Itga7) est une protéine spécifique du muscle, impliquée dans la prolifération et la différenciation des myoblastes (Liu, Burkin et al. 2008). Après avoir montré pour la première fois que cette protéine est exportée dans les exosomes sécrétés par les myotubes, nous avons transfecté des myotubes avec des siARNs dans le but de diminuer l'expression de l'intégrine Itga7. Après avoir isolé les exosomes sécrétés par les myotubes, nous avons montré que le taux d'ARNm de Itga7 est significativement réduit lorsque les myoblastes sont incubés en présence des exosomes sécrétés par les myotubes traités par les siARNs. Ce résultat suggère que les exosomes sécrétés pourraient transférer les siARNs dirigés contre Itga7 aux myoblastes et diminuer ainsi l'expression de la protéine Itga7 dans les cellules. Ces données confirment donc que les exosomes peuvent transférer horizontalement de petits ARNs entre les cellules, ce qui soulève des possibilités très intéressantes à des fins thérapeutiques.

Après avoir validé que des miARNs pouvaient être transmis entre les myotubes et les myoblastes *via* les exosomes, nous avons cherché à déterminer si les miARNs étaient fonctionnels dans la cellule receveuse et pouvaient diminuer l'expression de leurs gènes cibles. Pour cela, nous avons recherché tous les gènes cibles des miARNs des exosomes de myotubes, en utilisant les prédictions informatiques de TargetScan 6.0. Parmi tous les gènes cibles de plusieurs miARNs, nous avons choisi de nous intéresser au gène codant pour la sirtuin 1 qui est une histone déacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup>, essentielle à la prolifération des cellules musculaires (Rathbone, Booth et al. 2009), à leur survie (Saini, Al-Shanti et al. 2012), ainsi qu'à l'initiation de leur différenciation en cellules plurinuclées (Fulco, Schiltz et al. 2003). Au fur et à mesure de la différenciation en myotubes, la quantité de protéines Sirt-1 diminue tandis que le niveau d'expression du messager correspondant reste stable. Ce constat suggère une régulation négative de la traduction protéique par un ou plusieurs miARNs qui sont uniquement exprimés au cours de la différenciation des cellules musculaires (Yamakuchi 2012).

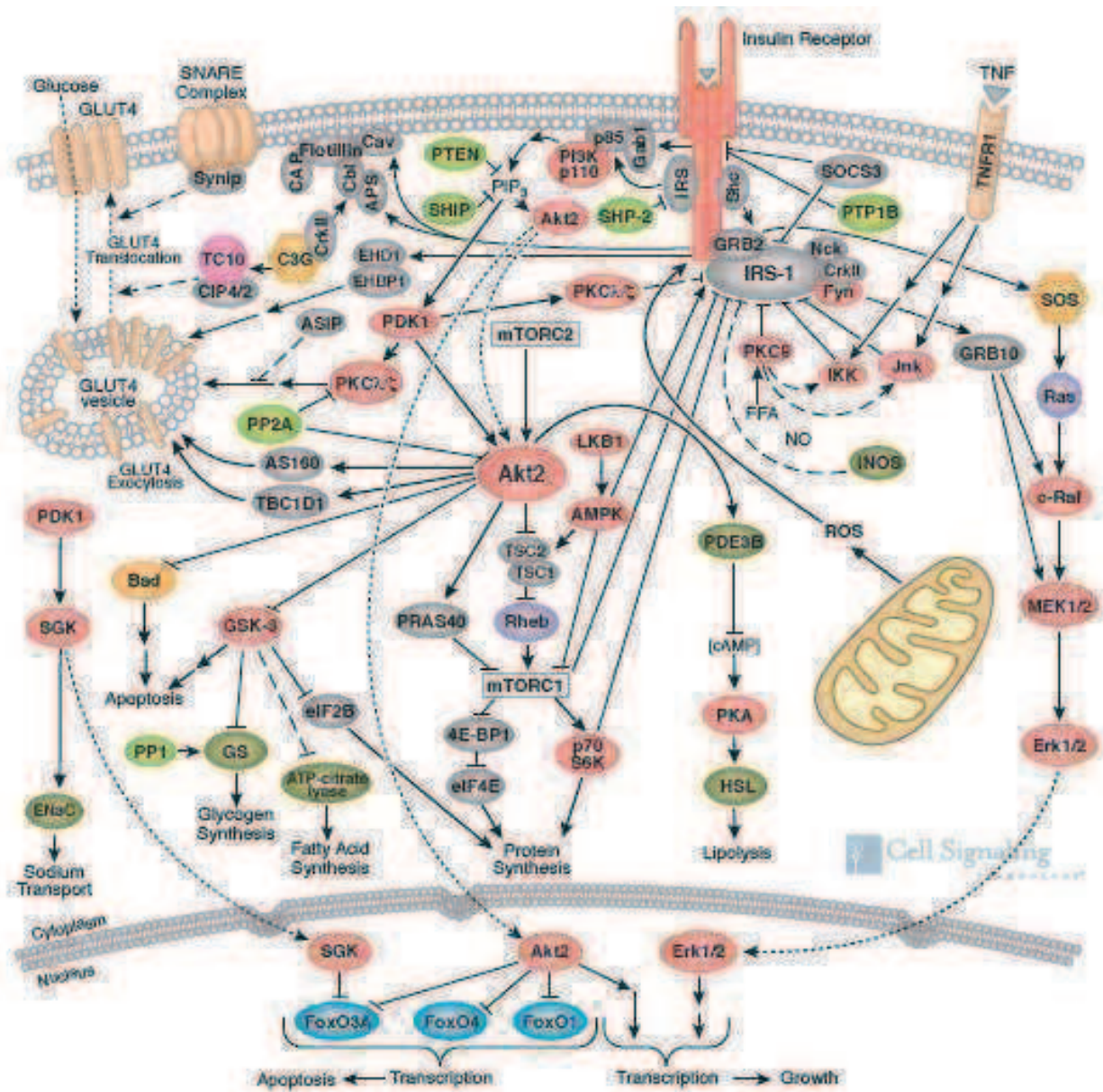
Nous avons utilisé une construction plasmidique contenant la partie 3'-UTR de Sirt1 couplée au gène rapporteur codant pour la luciférase. Le dosage de la luciférase a permis de montrer que le contenu en miARNs des exosomes de

myotubes était capable de modifier l'expression de la luciférase. Cette diminution est corrélée à une réduction de la protéine Sirt1. Ceci n'est pas observé quand on fait la même incubation avec des exosomes de myoblastes. Dans la littérature, plusieurs miARNs sont capables de réguler l'expression de Sirt-1. Parmi ces miARNs, miR-22 et miR-181a sont retrouvés dans les exosomes sécrétés par les myotubes (Yamakuchi 2012). En étudiant la séquence de la région 3'UTR de l'ARN messager de Sirt-1, nous avons observé la présence d'un site potentiel de reconnaissance et de fixation du microARN spécifique du muscle, miR-133a (utilisation du logiciel TargetScan 6.1). Comme précédemment décrit, ce myomiR est uniquement exprimé par les myotubes. De plus, il est exporté via les exosomes sécrétés, et peut être aussi transféré à d'autres cellules. Nous avons ensuite émis l'hypothèse que miR-133a serait capable de réguler l'expression de Sirt-1. Afin de confirmer que miR-133a est un potentiel répresseur de la traduction protéique du gène Sirt-1, la surexpression de ce myomiR a été réalisée par l'utilisation d'un adénovirus recombinant, qui contient la séquence du pré-miR correspondant. Les résultats obtenus ont montré que la surexpression de miR-133a entraîne une diminution des niveaux d'expression de l'ARN messager et de la protéine Sirtuin 1 dans la cellule musculaire en prolifération.

Dans ce chapitre, nous avons isolé les exosomes sécrétés par les cellules musculaires en prolifération (myoblastes) et les cellules musculaires différenciées (myotubes). La caractérisation du contenu en protéines et microARNs a permis de montrer que la composition des exosomes sécrétés par la cellule musculaire, reflétait son statut différencié ou non. De plus, nous avons montré que les exosomes sécrétés par la cellule musculaire étaient impliqués dans la prolifération des myoblastes et dans l'initiation de la différenciation myogénique. Enfin, nous avons montré que le contenu en microARNs des exosomes pouvait être transféré aux cellules et réguler l'expression de gènes cibles, impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation. D'autres études complémentaires seraient nécessaires afin de mieux comprendre le rôle des exosomes (via le transfert de son contenu en miARNs notamment) au cours de la différenciation des cellules musculaires, et de déterminer l'implication des miARNs contenus dans les exosomes dans le développement des pathologies musculaires.

## **Chapitre 2**

**Etude des exosomes sécrétés par  
les cellules musculaires en  
situation d'insulino-résistance  
induite par le palmitate**



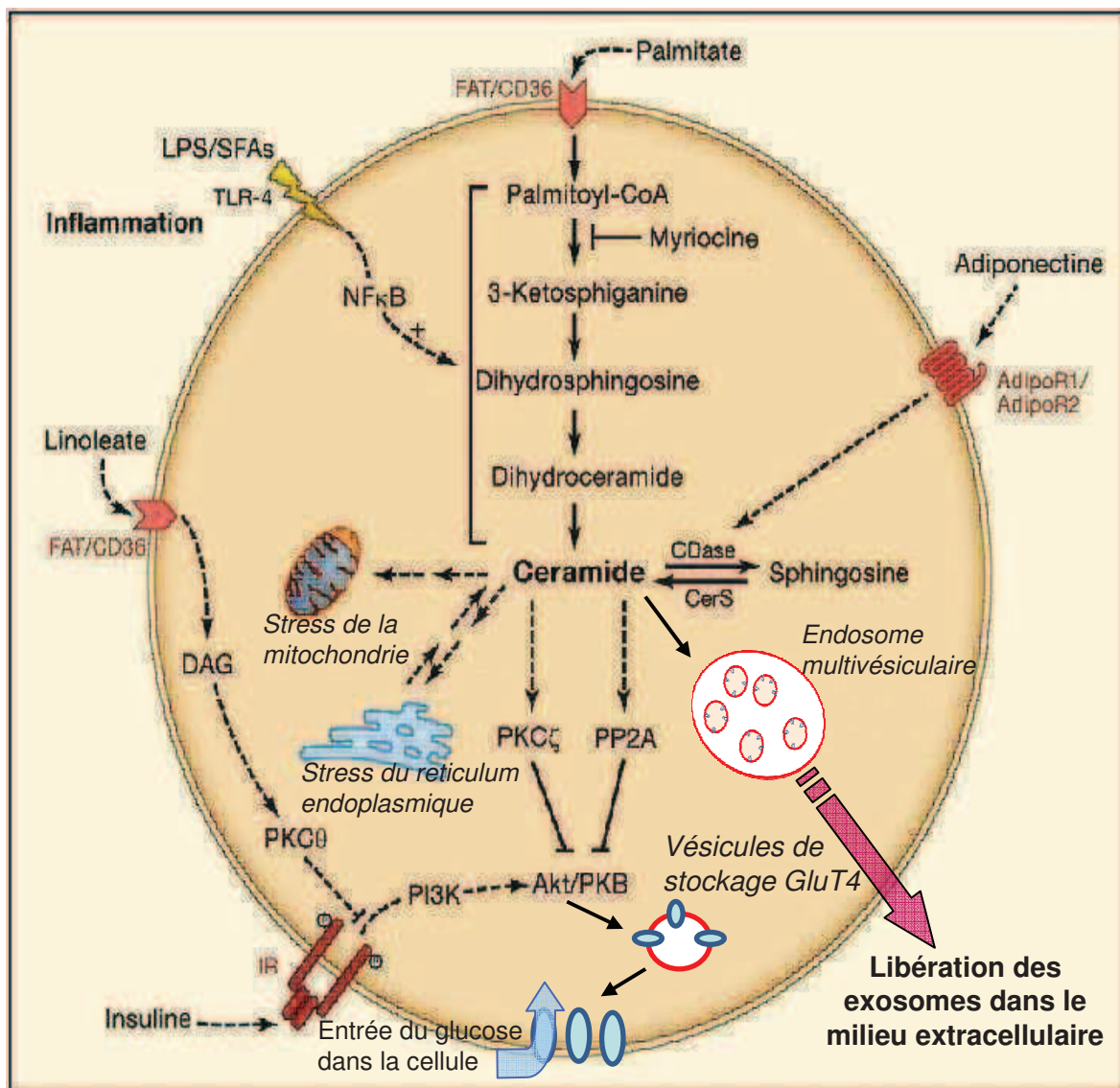
**Figure 31 La voie de signalisation de l'insuline**

d'après <http://www.cellsignal.com/pathways/glucose-metabolism.jsp>

# INTRODUCTION

L'insuline est la principale hormone responsable de la régulation du métabolisme glucidique et du maintien de la glycémie. Sécrétée par le pancréas, elle favorise le passage du glucose à travers les membranes et son stockage à l'intérieur des cellules, en particulier dans le muscle squelettique. Elle joue aussi un rôle important dans le contrôle d'autres processus métaboliques comme la synthèse et l'oxydation des acides gras, la lipolyse, l'absorption des acides aminés et la synthèse des protéines. En plus de ce rôle métabolique fondamental, l'insuline peut aussi agir comme facteur de croissance et comme régulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose dans divers types cellulaires. L'action de l'insuline est initiée par sa fixation sur un récepteur membranaire spécifique (Figure 31). Ceci entraîne la stimulation de l'activité tyrosine kinase du récepteur et la phosphorylation de différents substrats intracellulaires qui vont transmettre le message de l'insuline en activant plusieurs cascades de signalisation. Ces voies de signalisation conduisent à l'activation de facteurs de transcription qui vont moduler l'expression de gènes spécifiques.

Plusieurs pathologies importantes, comme le diabète de type 2 et l'obésité, sont associées à un défaut d'action de l'insuline dans ses tissus cibles. Cette anomalie, appelée insulino-résistance, est une des causes de l'hyperglycémie du diabète de type 2 et est le principal facteur de risque de maladies cardiovasculaires chez ces patients ainsi que chez les sujets obèses. En particulier, de plus en plus de travaux indiquent que l'augmentation des acides gras saturés (tel que le palmitate) dans notre alimentation participent au développement de l'insulino-résistance, conduisant à une réduction de la captation du glucose par le muscle (Dimopoulos, Watson et al. 2006). Au niveau mécanistique, l'action délétère du palmitate s'explique par son action inhibitrice sur la Protéine Kinase B (PKB, appelée aussi Akt) (Schmitz-Peiffer, Craig et al. 1999; Chavez and Summers 2003). Cette inhibition est due à la synthèse de novo de céramides, à partir du palmitate (Figure 32) L'utilisation d'inhibiteurs de la sérine palmitoyl-transférase, l'enzyme qui permet la synthèse de céramides à partir du palmitate, inhibe l'action délétère du palmitate sur la phosphorylation de la PKB (Ussher, Folmes et al. 2012). Les céramides entraînent



**Figure 32** Impact des céramides intracellulaires  
d'après Chavez and Summers 2012

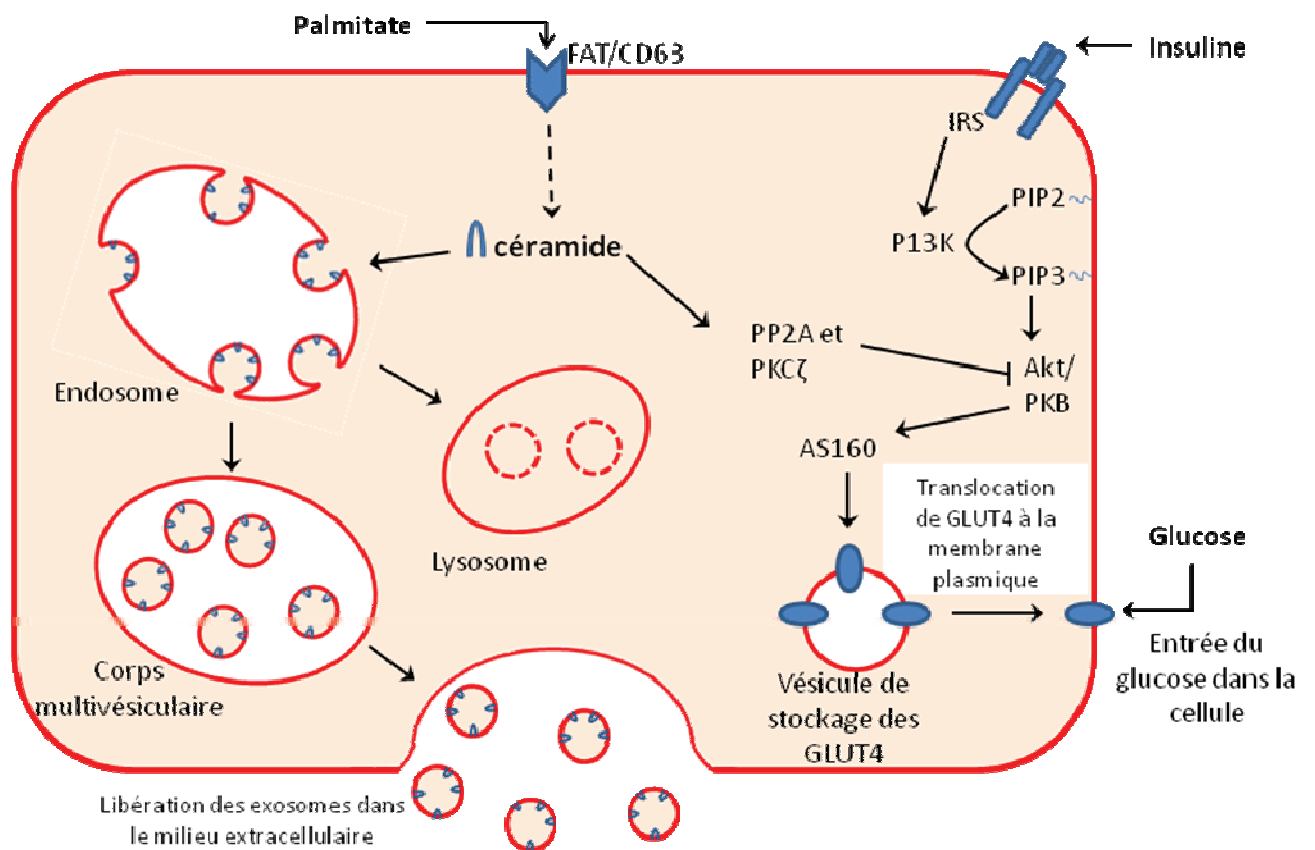


aussi une altération du fonctionnement des mitochondries et un stress du réticulum endoplasmique (Chavez and Summers 2003). L'inhibition de la phosphorylation de la PKB résulte d'au moins deux mécanismes : une inhibition de la translocation de la PKB vers la membrane plasmique par l'activation de la Protéine Kinase C zeta (PKC $\zeta$ ) et une stimulation de l'activité de la protéine phosphatase 2 (PP2A), responsable de la déphosphorylation de la PKB qui est alors dans son état inactif (Chavez and Summers 2003) (Figure 32).

Comme l'insulino-résistance musculaire est un évènement précoce dans le développement du diabète et précède la diminution de la sécrétion d'insuline par le pancréas, conduisant au diabète de type 2, il a été postulé que le muscle, en sécrétant un message moléculaire particulier, pouvait moduler l'homéostasie des autres tissus insulino-sensibles. Depuis 10 ans, un certain nombre d'études a confirmé cette hypothèse et montré que le muscle était en fait un organe capable de sécréter des cytokines (appelées myokines), en particulier l'Interleukine-6 (IL-6) (Yoon, Kim et al. 2012), pouvant servir de signaux pour d'autres tissus (le tissu adipeux, le foie et le pancréas), en plus de ses propriétés pro- et anti-inflammatoires (Figure 33). Dans ce contexte, il a été démontré qu'une augmentation plasmatique d'IL-6 était corrélée à une insulino-résistance, à un risque de maladies coronariennes élevé, et au diabète de type 2 (Bunn, Cockrell et al. 2010). De façon intéressante, le palmitate (et non les acides gras insaturés) induit l'expression de l'IL-6 dans un modèle *in vitro* de myotubes humains (Weigert, Brodbeck et al. 2004). Dans le chapitre précédent nous avons montré que la cellule musculaire sécrétait aussi des exosomes, impliqués dans la myogenèse, notamment en transférant des miRNAs.

Comme écrit dans l'introduction bibliographique, les céramides sont également impliqués dans la biogenèse des exosomes (Trajkovic, Hsu et al. 2008). Ainsi, en prenant en compte toutes ces données, nous avons émis 2 hypothèses :

- Une accumulation de céramides dans les cellules musculaires pourrait modifier la composition et la sécrétion des exosomes (Figure 33).
- Une altération de la synthèse d'exosomes pourrait être associée à des modifications de leurs contenus (protéines, miARNs et ARNm) modifiant ainsi leurs actions biologiques.



**Figure 33** Implication des céramides dans la biogenèse des exosomes et dans l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé des cellules musculaires C2C12, dont nous avons préalablement caractérisé les exosomes, ainsi qu'un modèle de souris ayant reçu une diète enrichie en palmitate (20%) (Modèle mis au point dans le laboratoire par Jennifer Rieusset et Guillaume Vial). Nous avons déterminé si les cellules musculaires insulino-résistantes modifiaient la composition de leurs exosomes (leur population de miARNs notamment) et pouvaient transmettre un message délétère au sein du tissu musculaire.

# RESULTATS

Dans un premier temps, nous avons déterminé la quantité minimale de palmitate à mettre sur les cellules C2C12 pour avoir à la fois une altération de la voie de signalisation de l'insuline, mais aussi une altération qui perdure dans le temps afin de collecter des milieux conditionnés, sans palmitate. En effet nous avons pensé que le palmitate non incorporé par les cellules qui pourrait interférer avec les signaux moléculaires sécrétés par les cellules (en l'occurrence les exosomes), dont on cherchait à caractériser l'effet. Nous avons utilisé le niveau de phosphorylation de la PKB (pPKB), après une stimulation de 15 minutes des cellules par de l'insuline humaine (100nM), pour valider l'effet du palmitate sur la voie de signalisation de l'insuline. Afin de normaliser les niveaux de phosphorylation de cette protéine par rapport à la quantité de protéine totale de chaque échantillon, nous avons utilisé l'actine.

## **Détermination de la concentration et du temps d'incubation des C2C12 avec le palmitate pour altérer la phosphorylation de la PKB**

En consultant la bibliographie publiée sur le sujet, il s'est avéré difficile de déterminer la quantité de palmitate à utiliser pour induire l'insulino-résistance des C2C12. En effet, en fonction des altérations étudiées (mitochondrie, stress du réticulum, ou signalisation de l'insuline), et des modèles cellulaires, différentes concentrations et différents temps sont utilisés. Nous avons donc, dans un premier temps testé, les concentrations les plus couramment utilisées dans la littérature, soit 200, 500 et 700  $\mu\text{M}$  ; ainsi que différents temps d'incubation (9, 18 et 24 heures). Les résultats illustrés en Figure 34, montrent que la concentration à 200 $\mu\text{M}$  de palmitate n'est pas suffisante pour altérer le signal de l'insuline sur des C2C12, avant 24 heures de traitement. Or les cellules sont maintenues dans un milieu sans sérum, qui en plus du palmitate induit un stress. Donc nous avons éliminé cette concentration. Pour 500 et 700 $\mu\text{M}$ , on détecte une altération de la phosphorylation de la PKB aux temps 18 heures et 24 heures. Nous avons choisi de considérer la concentration de 500 $\mu\text{M}$ , pour réduire la concentration de palmitate, qui à de fortes concentrations

peut induire une apoptose, et nous avons gardé le temps de 18 heures, pour réduire le temps de culture des C2C12 dans un milieu sans sérum.

### **Maintien de l'altération de la phosphorylation de la PKB dans le temps**

Afin de préparer des milieux conditionnés de cellules C2C12 traitées avec 500µM de palmitate pendant 18h, nous avons essayé de déterminer si l'altération de la phosphorylation de la PKB perdurait dans le temps. Les résultats montrés (Figure 35) indiquent que jusqu'à 12 heures post-traitement les cellules restent insulino-résistantes. Au bout de 24 heures, on observe de nouveau une phosphorylation de la PKB indiquant que le signal de l'insuline est restauré. Nous avons donc choisi d'utiliser les milieux conditionnés des temps 6 heures et 12 heures afin de déterminer si ces milieux contenaient un message moléculaire capable d'altérer la phosphorylation de la PKB de cellules musculaires.

### **Les milieux conditionnés des C2C12 incubés avec du palmitate, contiennent un signal délétère capable d'induire l'insulino-résistance à d'autres C2C12**

Les milieux conditionnés de cellules C2C12 cultivées pendant 18 heures avec 500µM de palmitate, puis cultivées pendant 6 heures, 12 heures et 24 heures sans palmitate, ont été utilisés pour cultiver de nouvelles C2C12. Au bout de 18 heures de traitement, nous avons déterminé le niveau de phosphorylation de la PKB par Western-Blot. Comme montré sur la Figure 36, les milieux conditionnés des temps post-6h et post-12h sont capables d'induire une insulino-résistance et de transmettre un signal qui affecte la phosphorylation de la PKB sur d'autres C2C12. Par contre, les milieux conditionnés du temps 24 heures n'ont pas d'action sur la phosphorylation de la PKB. Ceci est concordant avec les résultats de la Figure 35 qui montrent qu'à 24 heures, les cellules préalablement cultivées en présence de palmitate, ne sont plus insulino-résistantes. Nous avons utilisé le temps T0, contenant peut-être encore du palmitate, comme contrôle.

### **Effet des milieux conditionnés sans exosomes**

Afin de déterminer qu'elle était la part des exosomes dans la transmission de l'insulino-résistance, nous avons fractionné les milieux conditionnés. Dans un premier temps nous avons testé les milieux post-6h et post-12h, ne contenant plus d'exosomes. Ces milieux correspondent aux surnageants obtenus lors de la

purification des exosomes par ultracentrifugation. Comme indiqué sur la Figure 37, les milieux sans exosomes collectés à post-6h et post-12h, induisent une altération de la phosphorylation de la PKB. Seul le milieu collecté à post-6h a un effet significatif. Des expériences sont actuellement en cours pour augmenter le nombre de réplicats biologiques.

### **Effet des exosomes seuls**

Puis nous avons déterminé si les exosomes seuls pouvaient aussi véhiculer un signal capable d'altérer la signalisation de l'insuline. Au vu des résultats précédents, nous aurions dû utiliser les exosomes des temps post-6h. Or nous n'avons pu utiliser que les exosomes du temps post-12h, car nous n'avons pas eu assez d'exosomes sécrétés par les cellules dans les milieux post-6h. En parallèle, nous avons étudié aussi l'action des exosomes post-24h comme contrôle, car nous savions qu'à ce temps, les cellules n'étaient plus insulino-résistantes (Figure 35).

Comme indiqué sur la Figure 38, les exosomes collectés à post-12h, sont capables d'induire une insulino-résistance à des C2C12. Pour le temps post-24h, les résultats ne sont pas reproductibles, et on ne peut rien en conclure. Il s'agit des résultats d'une seule expérience (1 seule plaque 6-puits) et ces résultats sont en train d'être confirmés par des réplicats biologiques.

### **Caractérisation des exosomes sécrétés par le muscle squelettique de souris, nourries avec une diète riche en palmitate.**

Les céramides dérivés du palmitate entrant dans la composition des exosomes, nous avons pensé que la modification des concentrations intracellulaires en céramides pouvait modifier la sécrétion des exosomes en jouant sur leurs tailles et leur composition. Nous avons comparé la taille des exosomes sécrétés par des C2C12 contrôles, avec la taille des exosomes sécrétés par des C2C12 incubées pendant 18h avec du palmitate. En parallèle, nous avons incubé pendant 24h des muscles de souris C57Bl/6 nourries soit avec un régime standard, soit avec un régime enrichi en palmitate pendant 16 semaines (*Quadriceps*). Au bout de 16 semaines, ces souris sont insulino-résistantes (Figure 39). La taille de leur muscle ne diffère pas significativement des souris contrôles (Figure 40). La taille des exosomes sécrétés a été analysée par granulométrie. Dans les 2 modèles, *in vitro* et *in vivo*, nous retrouvons une augmentation de la taille des exosomes (Figure 40). En

parallèle, nous observons que les muscles des souris ayant reçu une diète riche en palmitate, secrètent moins d'exosomes ; données rapportées aux poids des muscles qui restent stables (Figure 40)

### **Caractérisation des miARNs présents dans les exosomes sécrétés par le muscle squelettique de souris, nourries avec une diète riche en palmitate**

La taille et la quantité d'exosomes sécrétés ayant changé pour les muscles de souris ayant reçu une diète riche en palmitate, nous avons pensé que la composition en miARNs pouvait être modifiée. Nous avons utilisé les exosomes sécrétés par le muscle de 3 souris contrôles et 3 souris insulino-résistantes et extrait leur miARNs par une technique classique d'extraction d'acide nucléique, basée sur l'utilisation de phenol-chloroforme. Puis nous avons utilisé les TLDA TaqMan Low Density Arrays (Lifetechnology) pour amplifier et quantifier par PCR, les miARNs contenus dans ces exosomes. Nous avons normalisé les données (Deo, Carlsson et al. 2011) et sélectionnés les miARNs amplifiés dans les 6 échantillons. Les résultats sont les suivants :

Identifiants	valeurs <i>p</i> du test-t	Souris contrôles	Souris ayant reçu un régime HP
<b>mmu-miR-491</b>	0,000333598	<b>31,98 ± 0,58</b>	0
<b>mmu-miR-324-3p</b>	0,00038047	<b>29,98 ± 0,58</b>	0
<b>mmu-miR-146a</b>	0,03621453	<b>30,49 ± 0,25</b>	31,73 ± 0,31
<b>mmu-miR-92a</b>	0,036287616	<b>27,06 ± 0,4</b>	28,81 ± 0,4
<b>mmu-miR-16</b>	0,039471471	<b>31,86 ± 0,16</b>	30,79 ± 0,28
<b>hsa-miR-93*</b>	0,034252438	<b>35,07 ± 0,39</b>	32,94 ± 0,52
<b>hsa-miR-196a</b>	0,04228853	<b>35,74 ± 0,58</b>	31,98 ± 0,99

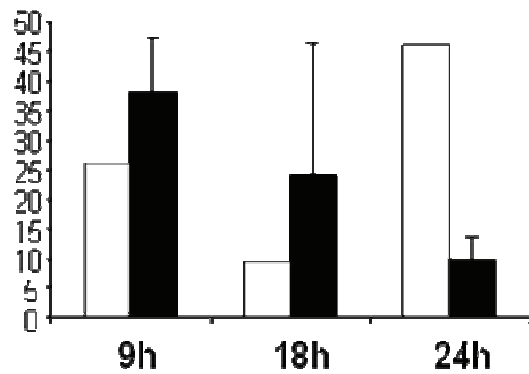
*Valeurs de Ct des microARNs significativement différenciellement exprimés dans les exosomes sécrétés par les muscles de souris ayant reçus un régime standart (Liu, Carmell et al.) en comparaison avec des souris ayant reçu un régime enrichi avec 20% de palmitate (HP). La valeur 0, veut dire que le microARN n'est pas détecté. Les valeurs de *p* du test-t de student sont considérées comme significatives quand *p*<0.05. La comparaison avec l'expression de ces miARNs dans les muscles n'a pas été réalisée.*

Des travaux sont actuellement en cours afin de savoir si ces régulations sont aussi observées dans les exosomes de C2C12 traitées ou non au palmitate. Les miARNs trouvés différenciellement régulés dans ces 2 modèles (*in vivo* et *in vitro*) seront étudiés afin de déterminer leurs potentiels actions dans la transmission d'un

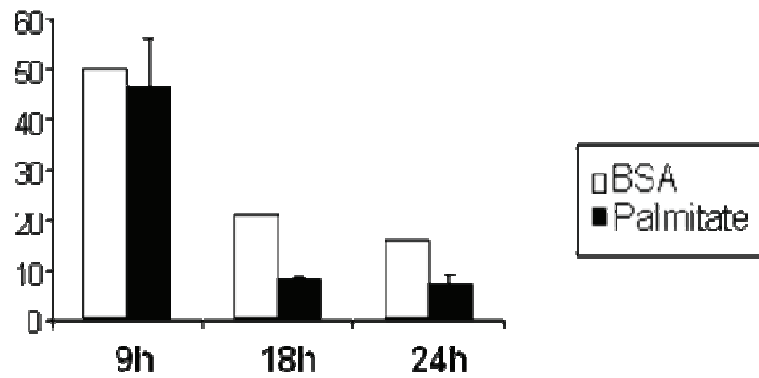
signal délétère sur la phosphorylation de la PKB au sein du muscle squelettique, ou à d'autres tissus insulino-sensibles comme le pancréas.



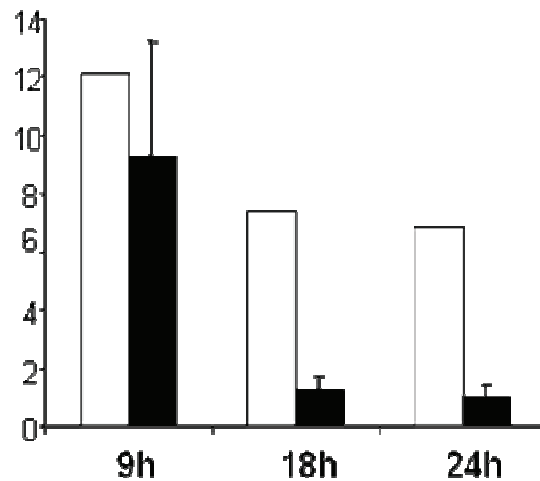
Unités arbitraires (pPKB/actine) après stimulation à l'insuline / (pPKB/actine) sans stimulation à l'insuline



Temps de traitement de 200  $\mu\text{M}$  de palmitate (h)

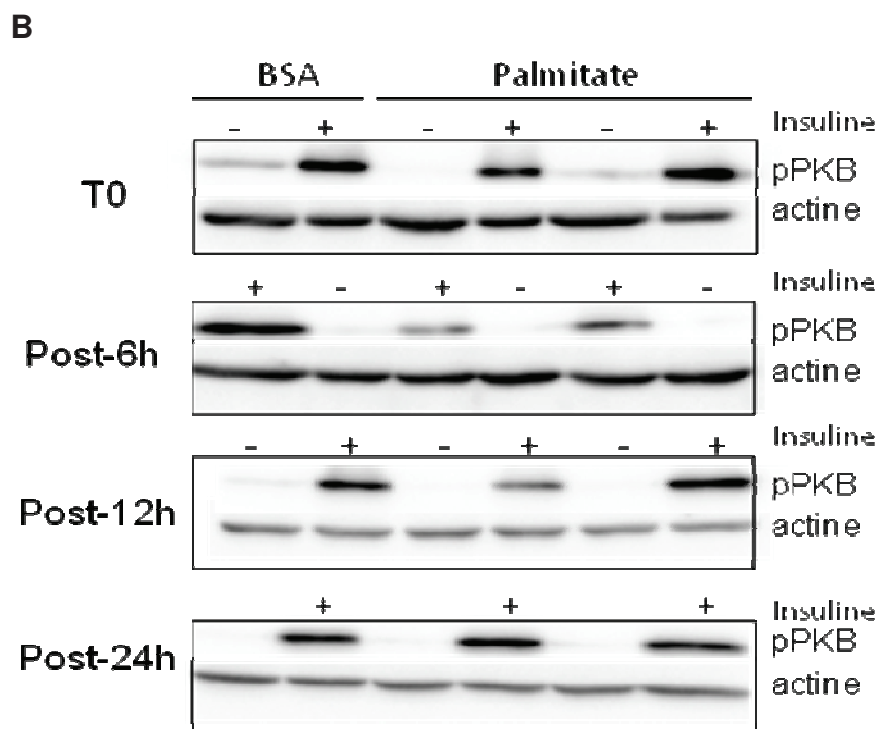
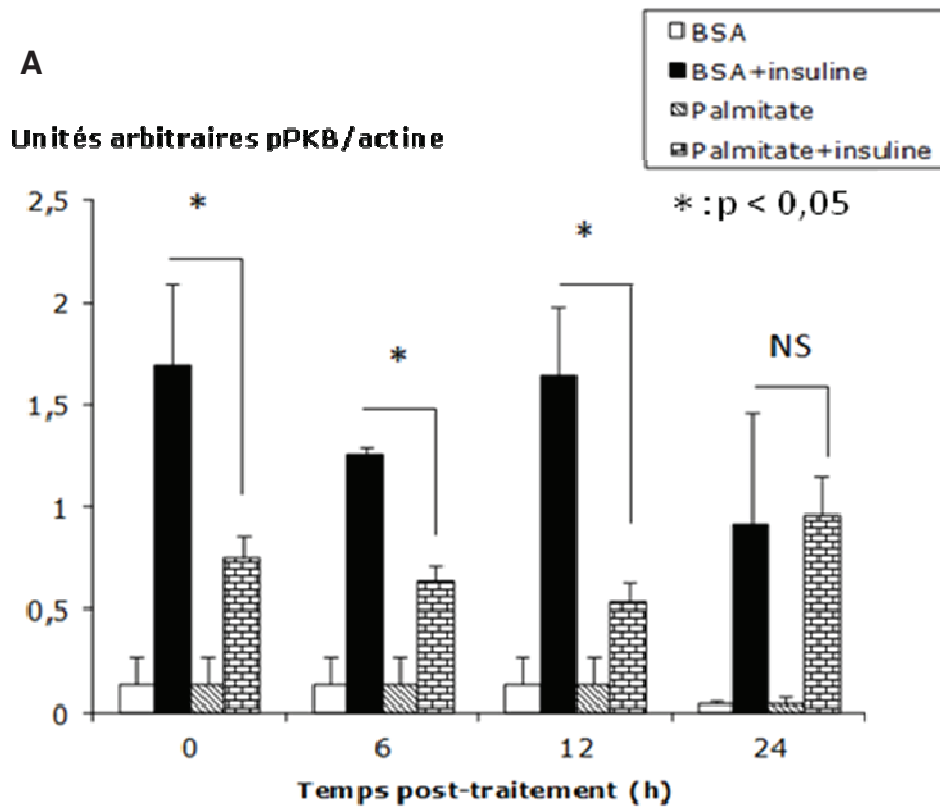


Temps de traitement à 500  $\mu\text{M}$  de palmitate (h)



Temps de traitement à 700  $\mu\text{M}$  de palmitate (h)

Figure 34 Phosphorylation de la PKB dans des myotubes C2C12 différenciés, traités avec différentes concentrations de palmitate et incubés à différents temps.



**Figure 35 A.** Maintien de l'altération de la phosphorylation de la PKB après 6 et 12h de post-traitement au palmitate. **B.** Révélation par Western-Blot de la phosphorylation de PKB (pPKB), normalisé par rapport à l'actine.

Unités arbitraires (pPKB/actine) après stimulation à l'insuline / (pPKB/actine) sans stimulation à l'insuline

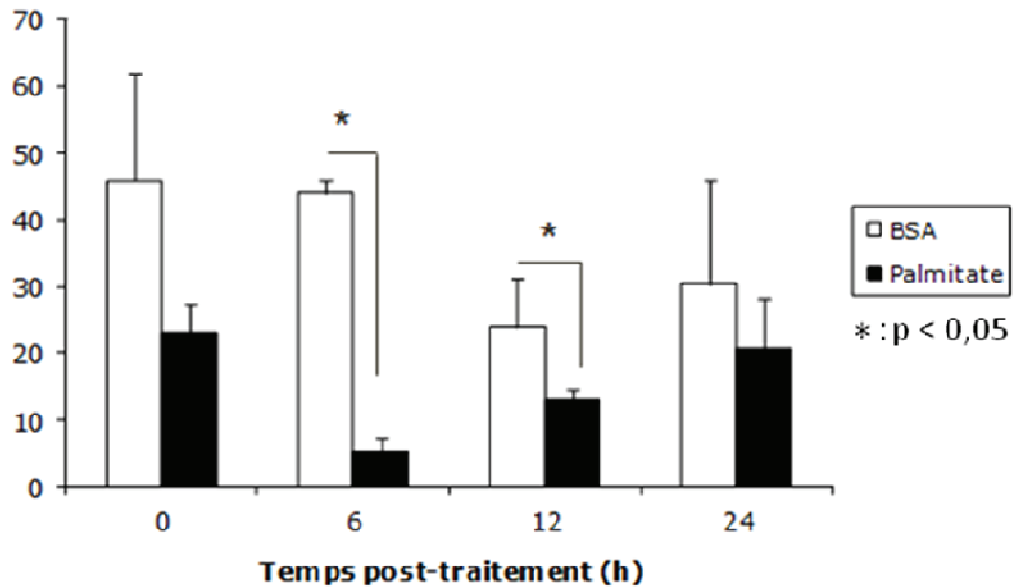
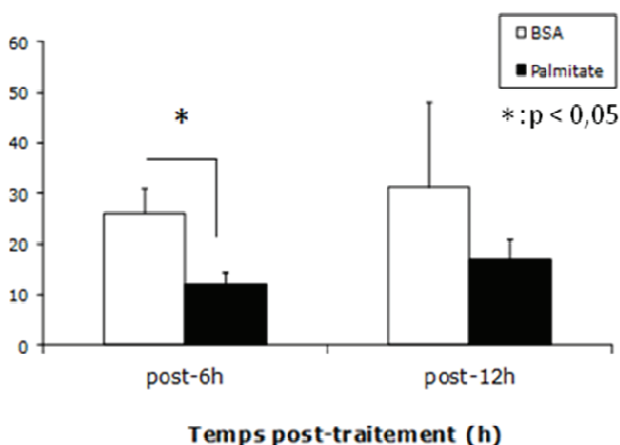


Figure 36 Effet des milieux conditionnés complets collectés à partir de surnageants de culture de C2C12 pré-incubées pendant 18h avec du palmitate. Les milieux collectés après 6h et 12 de post-traitement entraînent une baisse significative de la phosphorylation de la PKB. Les milieux conditionnés prélevés à 24h post-traitement n'entraînent pas d'altération de la PKB.

A.

Unités arbitraires (pPKB/actine) après stimulation à l'insuline / (pPKB/actine) sans stimulation à l'insuline



B.

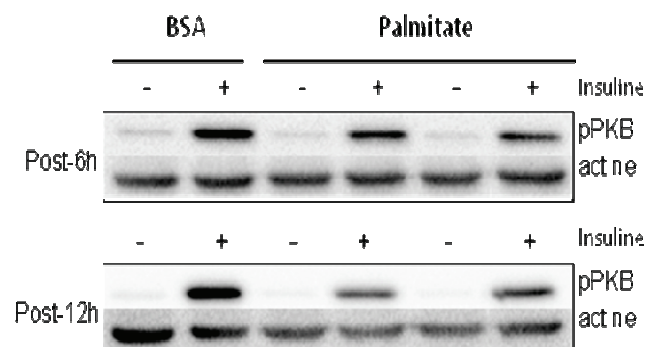


Figure 37 A. Effet des milieux conditionnés collectés à partir de surnageants de culture de C2C12 pré-incubées pendant 18h avec du palmitate, ne contenant plus d'exosomes. Les milieux collectés après 6h de post-traitement entraînent une baisse significative de la phosphorylation de la PKB. Les milieux conditionnés prélevés à 12h post-traitement n'entraînent pas d'altération de la PKB B. Révélations par Western-Blot de la phosphorylation de la PKB (pPKB), normalisée par rapport à l'actine.

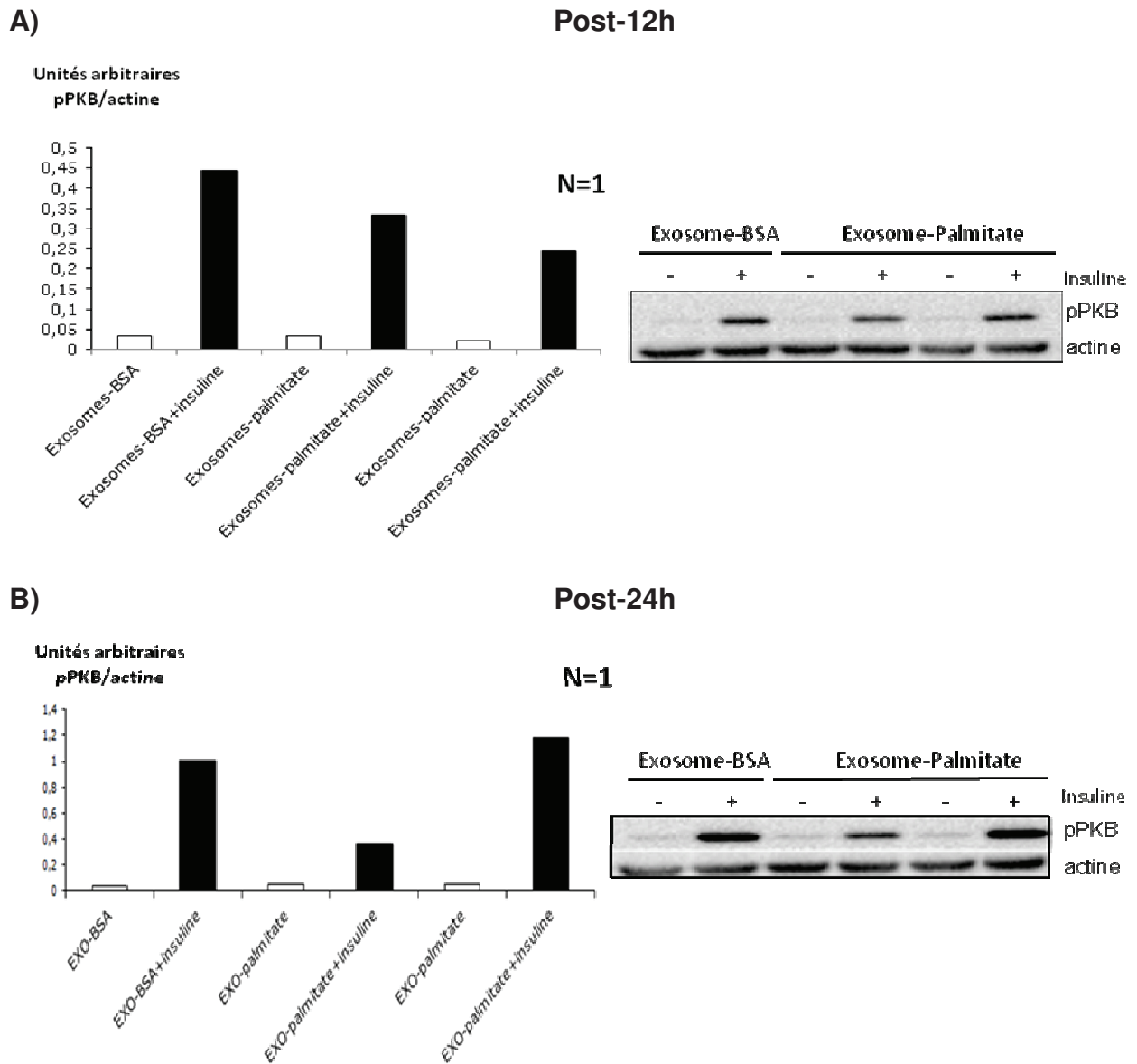
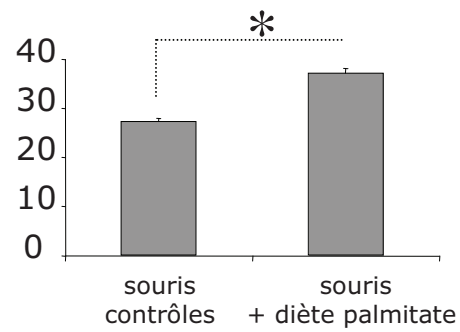
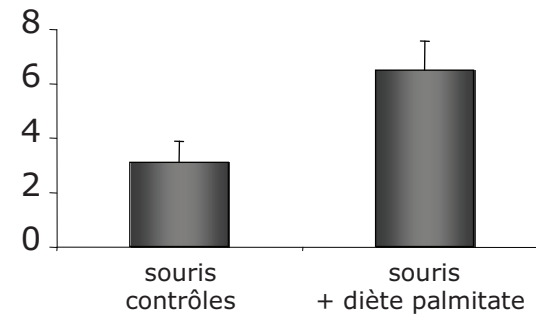


Figure 38 Effets des exosomes isolés des milieux conditionnés post-12h **A)** et post-24h **B)**. Les exosomes des milieux post-12h semblent induire une diminution de la phosphorylation de la pPKB. Ces expériences sont en cours de répétition.

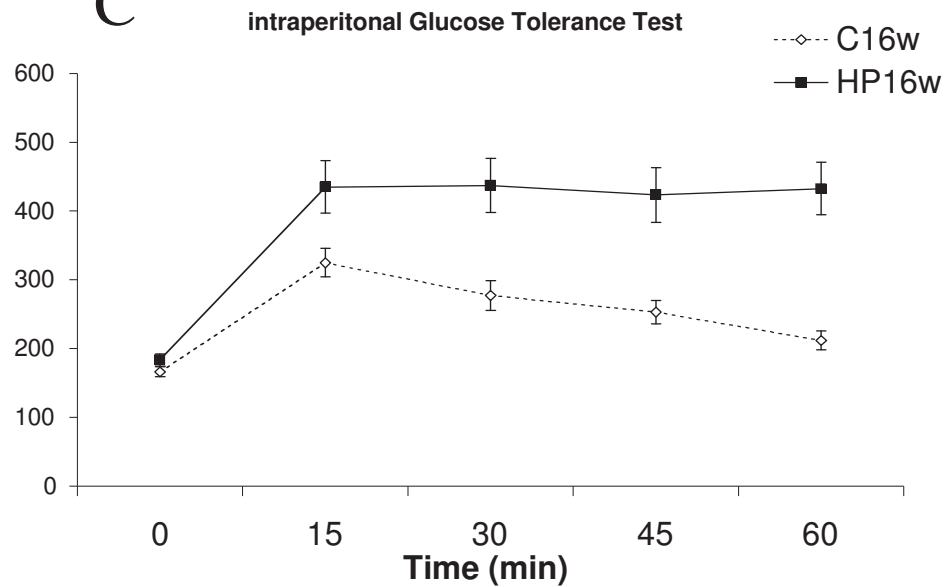
**A** Poids des souris (g)



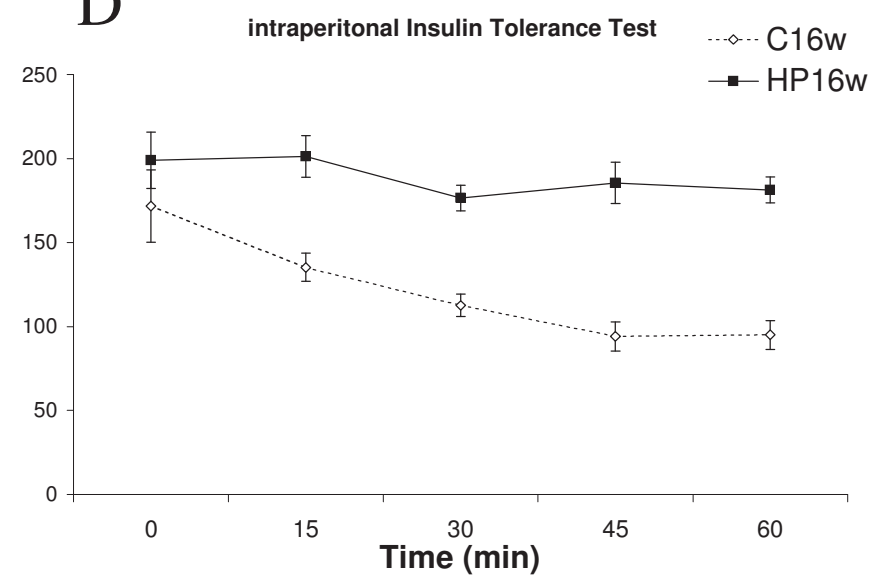
**B** Insuline (ng/ml)



**C** intraperitoneal Glucose Tolerance Test

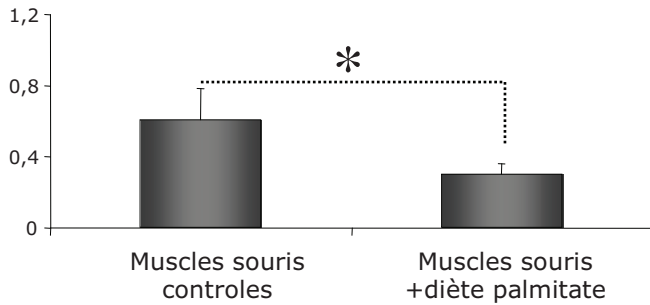


**D** intraperitoneal Insulin Tolerance Test

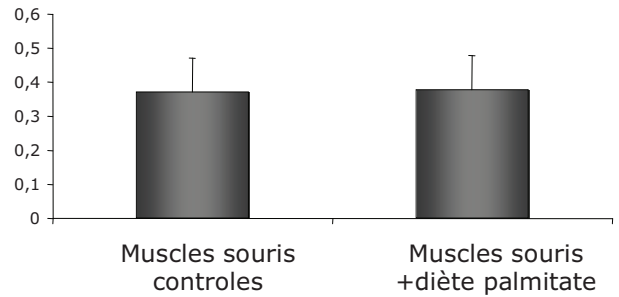


**Figure 39** 16 semaines de diète enrichie en palmitate (20%) induisent une insulino-résistance chez la souris A. Poids des souris, B. Insulinémie, C. Test de tolérance au glucose, D. Test de tolérance à l'insuline.

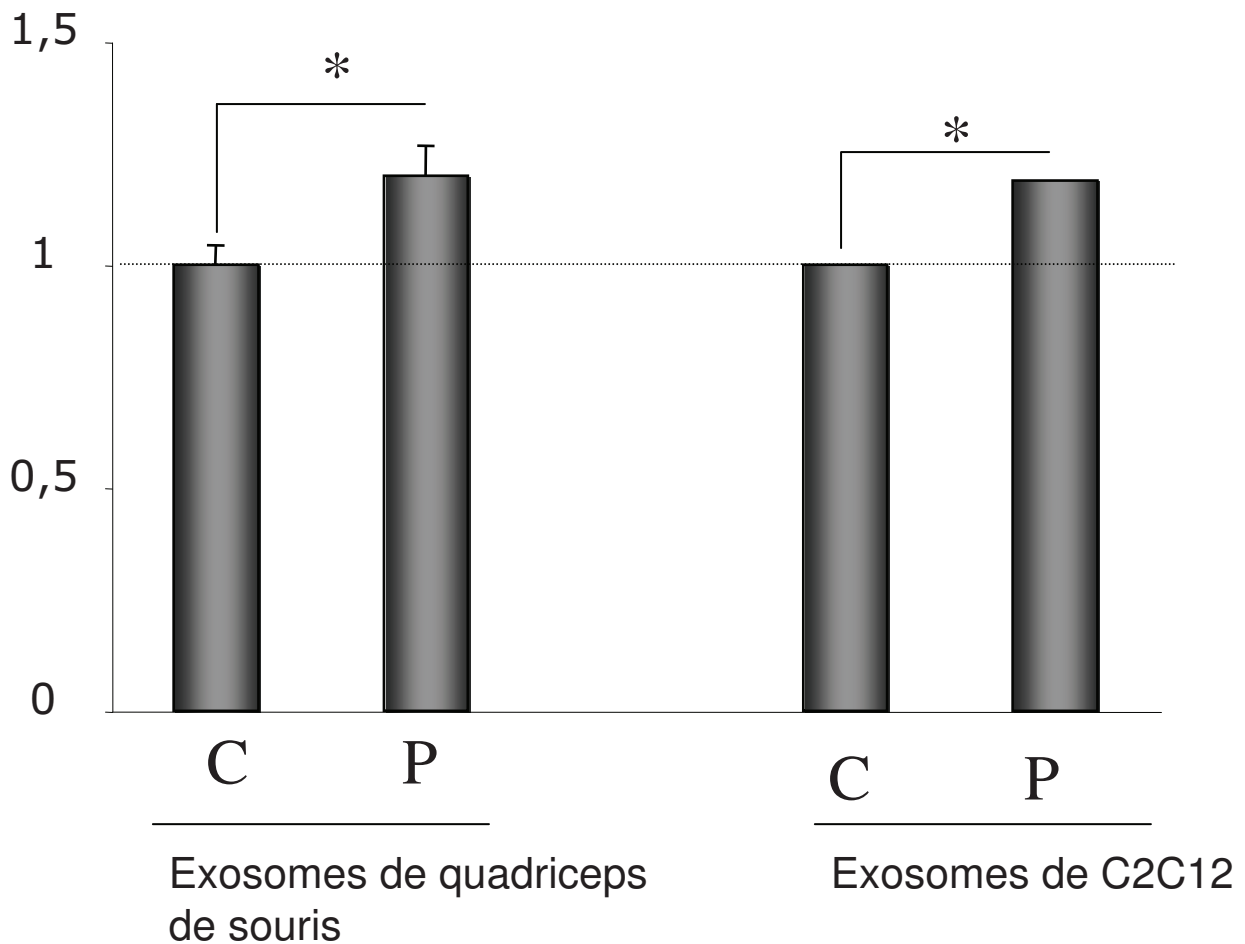
**A Concentrations en exosomes (µg/µl)**



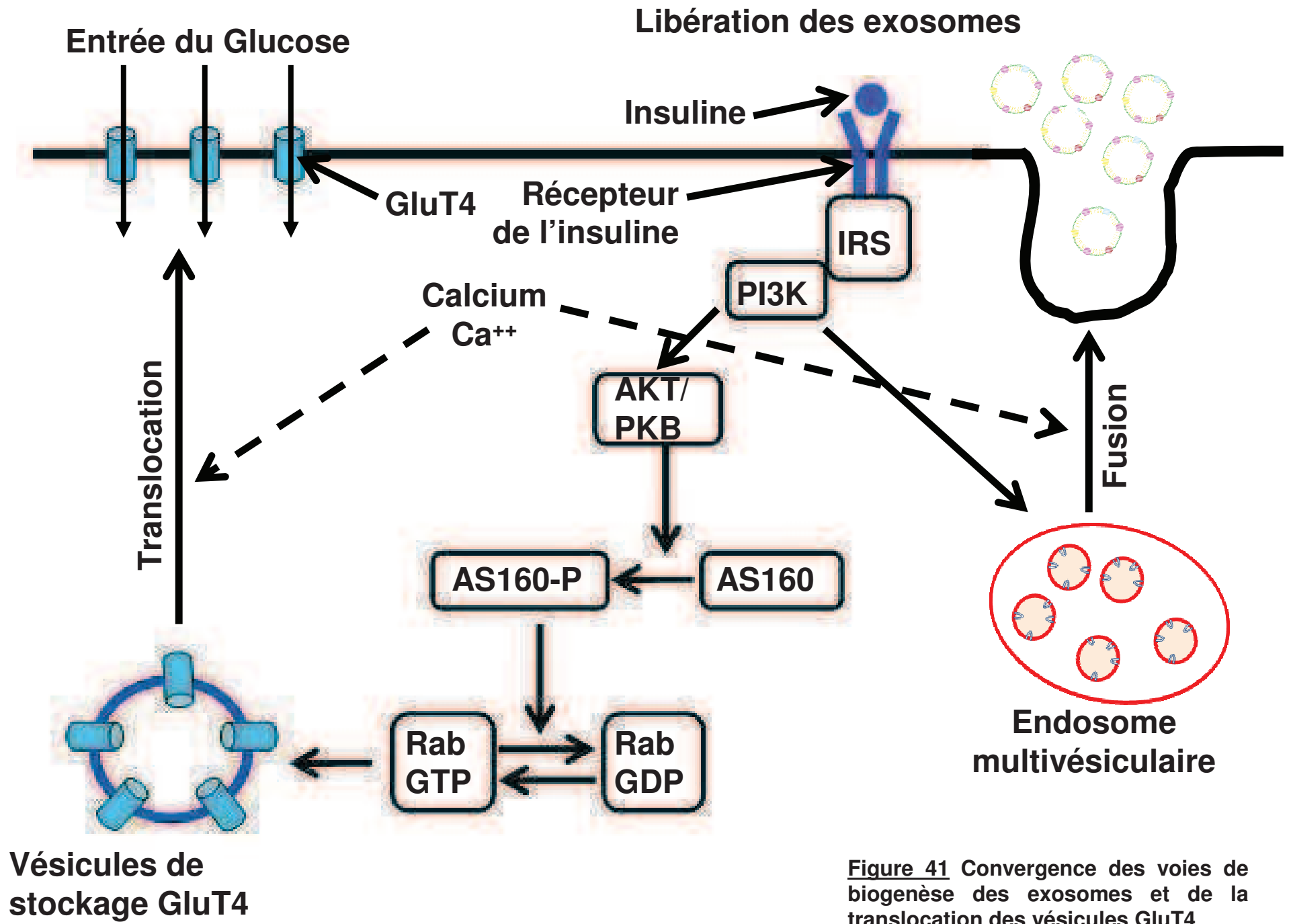
**B Poids des quadriceps (g)**



**C Tailles des exosomes**



**Figure 40** Caractérisation des exosomes sécrétés par la cellule musculaire rendue insulino-résistante par du palmitate. A. Concentration des exosomes sécrétés. B. Poids des muscles, C. Taille des exosomes (modèle *in vivo* à gauche et *in vitro* à droite).



**Figure 41** Convergence des voies de biogenèse des exosomes et de la translocation des vésicules GluT4

# DISCUSSION

Les céramides (issus en particulier du métabolisme du palmitate) sont de puissants régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'insuline, dont l'importance dans les phénomènes d'insulino-résistance est clairement démontrée dans le muscle (Schmitz-Peiffer, Craig et al. 1999). Au cours de ce dernier travail, nous avons voulu déterminer si la sécrétion d'exosomes par des cellules musculaires murines C2C12, rendues insulino-résistantes en présence de palmitate était affectée et si les exosomes sécrétés avaient une composition particulière en miARNs.

En effet, comme cela est résumé sur la Figure 41, la voie de signalisation impliquant la phosphoinositol 3 kinase (PI3K), nécessaire à la translocation des vésicules GluT4 à la membrane en réponse à l'insuline, est aussi impliquée dans la formation des endosomes multivésiculaires (Fernandez-Borja, Wubbolts et al. 1999). Ces travaux publiés en 1989 indiquent que la Wortmannin, un inhibiteur irréversible sélectif de la PI3K, empêche la formation des exosomes à l'intérieur des endosomes multivésiculaires. En situation d'insulino-résistance, la réponse à l'insuline étant altérée, nous avons postulé que la formation des endosomes multivésiculaires pouvait donc être touchée. En parallèle, il a été montré que le relargage des exosomes, comme la translocation des vésicules GluT4 à la membrane est dépendant des concentrations intra- et extracellulaires en calcium (Savina, Furlan et al. 2003; Lanner, Bruton et al. 2008). Dans le muscle squelettique, les échanges calciques jouent un rôle physiologique majeur. La contraction musculaire, mais aussi la réponse à l'insuline, augmentent les niveaux de calcium intracellulaire, permettant la translocation des vésicules GluT4 à la membrane et la captation du glucose par le muscle. Or l'insulino-résistance est associée à une diminution des échanges calciques au cours de la contraction musculaire et de la réponse à l'insuline (Santos, Ribeiro et al. 2008), suggérant une diminution de la sécrétion d'exosomes par le muscle squelettique.

Des précédents travaux étudiant l'effet prolongé d'une exposition au palmitate sur des muscles *soleus* de rats, ont montré qu'il existait 2 phases dans l'induction de l'insulino-résistance musculaire (Alkhateeb, Chabowski et al. 2007); une phase précoce avant 6 heures qui se traduit par une inhibition de la translocation des



transporteurs GLUT4 à la membrane ; et une phase plus tardive après 12 heures, qui se traduit aussi par une inhibition de l'activité intrinsèque des transporteurs GLUT4. La 1<sup>ère</sup> phase est associée à une augmentation intracellulaire des céramides et du diacylglycérol, de l'inhibition du signal de l'insuline. Au cours de ce travail, il est donc vraisemblable qu'en utilisant un temps de 18h d'incubation au palmitate, on cumule les deux effets.

De façon intéressante, nous avons trouvé que les cellules restent insulino-résistantes, au moins 12 heures après que l'on ait retiré le palmitate du milieu de culture. Par contre, l'effet est réversible car après 24 heures sans palmitate, les cellules redeviennent insulino-sensibles. Il n'y a donc pas de modifications de l'ADN, de type épigénétique. Ceci avait déjà été constaté *in vitro* sur un modèle de cellules pancréatiques (INS-1E cells) pré-incubées pendant 24 heures en présence de 200µM de palmitate et incubées de nouveau sans palmitate pendant 24 heures, en regardant l'inhibition de la transcription du gène de la Connexin36 (Allagnat, Alonso et al. 2008). Nous montrons que pendant toute cette période, les cellules C2C12 sécrètent dans leur milieu des composés (myokines non identifiées) capables de transmettre un signal délétère, qui affecte la signalisation de l'insuline, sur des cellules musculaires.

Des travaux réalisés par une équipe coréenne montrent que le milieu conditionné de macrophages RAW264.7 préalablement incubés avec 250µM de palmitate, est capable d'augmenter la prolifération de cellules musculaires lisses (Rat aortic smooth muscle cells), suggérant un effet paracrine, et la sécrétion de cytokines délétères. Ceci a été confirmé par une autre équipe plus récemment (Kewalramani, Fink et al. 2011), qui montre que le milieu de culture de cellules RAW264.7 préalablement incubés avec 500µM de palmitate est capable d'induire l'insulino-résistance de cellules musculaires L6, en inhibant la phosphorylation de IRS1, et la captation du glucose. Nos résultats indiquent que les cellules musculaires pré-incubées avec du palmitate puis cultivées sans palmitate, continuent de sécréter des composés pro insulino-résistants, tant que l'altération de la voie de signalisation de l'insuline persiste dans la cellule.

Afin de déterminer la part de tous ces composés, nous avons fractionné le milieu de culture. Nous avons collecté le milieu complet filtré à 0,2 µm, le milieu sans exosomes et la fraction exosomale. Il est à noter que le milieu complet ne contient plus les macroparticules supérieures à 200nm, pouvant aussi médier un effet

biologique (Rautou, Vion et al. 2011). Le milieu sans exosomes a le même effet délétère sur la phosphorylation de la PKB que le milieu complet. Ceci laisse penser à une action possible de composés type « myokines » (Bouzakri, Plomgaard et al. 2011). De façon intéressante, nos premiers résultats indiquent que les exosomes collectés à 12 heures post-traitement, auraient aussi un effet délétère sur la phosphorylation de la PKB, impliquant pour la première fois les exosomes dans une transmission de l'insulino-résistance musculaire, en plus des myokines. Ces travaux préliminaires réalisés seulement en duplicat devront être confirmés par des réplicats biologiques.

Nos résultats indiquent aussi que l'insulino-résistance musculaire est associée à une diminution de la sécrétion de la quantité d'exosomes *in vitro*, confirmant notre hypothèse de départ. Ces résultats sont confirmés *in vivo* sur un modèle murin nourri avec une diète riche en palmitate pendant 16 semaines. En parallèle, ces exosomes contiennent une population particulière en miARNs. Quatre miARNs sont plus exprimés dans les exosomes de muscles de souris contrôles (miR-491, miR-324-3p, miR-146a et miR92a). De façon intéressante, miR-146a a été montré comme significativement diminué dans les cellules mononucléées de patients diabétiques de type 2, par rapport à des sujets contrôles (Balasubramanyam, Aravind et al. 2011). De plus, l'expression de miR-146a est négativement corrélée à l'hémoglobine glyquée, à l'insulino-résistance et aux taux circulants de TNF- $\alpha$  et IL-6 chez ces patients (Balasubramanyam, Aravind et al. 2011). MiR-146a est également décrit dans la littérature comme étant différentiellement exprimé dans le sérum humain de sujets diabétiques de type 2 par rapport à des sujets prédiabétiques (impaired fasting glucose) (Karolina, Arumugam et al. 2011) et a été récemment impliqué dans la réponse inflammatoire (Xu, Wu et al. 2012). Nous trouvons aussi une augmentation de miR-16, miR-93\* et miR-196a dans les exosomes de muscles de souris avec la diète riche en palmitate. L'augmentation de miR-196a a été montrée comme pouvant médier l'adipogenèse du tissu adipeux brun chez la souris, en réprimant l'expression de C/EBPbeta, pouvant ainsi servir de cible thérapeutique pour induire l'adipogenèse du tissu brun et combattre l'obésité (Mori, Nakagami et al. 2012).

Pour déterminer le rôle de ces variations de miARNs dans les exosomes sécrétés par les cellules musculaires rendues insulino-résistantes dans le contexte plus général du diabète et de l'obésité, nous devons déterminer maintenant si ils

sont capables d'être transférés à d'autres types cellulaires et de réguler négativement l'expression des gènes de la cellule hôte. Pour l'instant, nous avons démontré dans le chapitre précédent que la cellule musculaire est capable de réintégrer ses propres exosomes et que les miARNs contenus dans ces exosomes sont fonctionnels. Or il a récemment été montré que tous les exosomes ne sont pas intégrés par tous les modèles cellulaires et qu'il y aurait une spécificité de reconnaissance, notamment au niveau du réseau d'intégrines et de tétraspanines présent à la surface des exosomes (Rana, Yue et al. 2012). Afin de déterminer si ces exosomes peuvent être considérés comme de nouveaux acteurs dans le dialogue moléculaire entre les organes qui s'installe au cours de l'insulino-résistance, il nous faudra déterminer si d'autres tissus insulino-sensibles (pancréas, tissu adipeux et foie) sont capables d'intégrer des exosomes issus des cellules musculaires. De plus, il nous faudra déterminer les gènes cibles des miARNs transférés par ce mode exosomal.

# **CONCLUSION GENERALE**

Au cours de ces trois années de thèse, nous avons montré que la cellule musculaire était capable de sécréter des exosomes et nous avons confirmé que le contenu en protéines et miARNs de ces exosomes est dépendant du statut physiopathologique de la cellule qui les sécrète : cellules musculaires prolifératives, différenciées ou insulino-résistantes. Ce contenu spécifique constitue ainsi une signature moléculaire qui peut être utilisée comme application thérapeutique. En effet, les exosomes pourraient dès lors être utilisés comme biomarqueurs pour la prédiction, le diagnostic et le suivi de différentes pathologies comme les cancers et les maladies métaboliques (obésité et diabète de type 2).

Par ailleurs, dans la littérature, les exosomes sont décrits comme ayant un rôle dans la communication intercellulaire. Dans notre modèle *in vitro* de cellules musculaires (lignée C2C12), nous avons observé que les cellules sécrétaient peu d'exosomes. Il se pose alors la question de savoir si ces exosomes sont réellement fonctionnels *in vivo*, dès lors qu'ils sont libérés dans le milieu extracellulaire. Cette question soulève donc la nécessité de comprendre le mode de reconnaissance et de capture des exosomes par des cellules spécifiques ou non. Il est également nécessaire de déterminer le mode de libération du contenu dans la cellule receveuse, afin de comprendre l'action de ce contenu - en miARNs notamment - sur l'expression des gènes cibles.

En outre, étant donné que la formation des exosomes est liée à la voie endosomale et qu'en situation d'insulino-résistance la libération des exosomes, par les cellules musculaires serait altérée, nous pouvons envisager d'étudier le lien entre la formation des exosomes et l'insulino-résistance. Dans notre modèle *in vitro* physiopathologique d'insulino-résistance, nous avons utilisé le palmitate, un acide gras qui induit une insulino-résistance en inhibant l'action de la protéine PKB/Akt,

protéine clef et au carrefour de nombreuses cascades d'activation dans la voie de signalisation de l'insuline. C'est pourquoi, dans un premier temps il est nécessaire d'étudier la biogénèse des exosomes dans d'autres modèles d'insulino-résistance, et notamment dans ceux où les protéines IRS ne sont plus fonctionnelles (modèles murins *ob/ob* et DIO). Ces modèles seront plus représentatifs de la réalité biologique de la pathologie, étant donné que les protéines IRS sont celles majoritairement concernées et responsables du défaut de signalisation suite à la fixation de l'insuline sur son récepteur.

Enfin, nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'altération de la biogénèse des exosomes pourrait rendre une cellule musculaire insulino-résistante. En effet, étant donné que le trafic des vésicules GluT4 (stockage et localisation intracellulaire) est étroitement liée à la voie endosomale, une altération de l'expression des protéines clefs de cette voie pourrait d'une part altérer la biogénèse des exosomes et d'autre part être responsable d'un défaut de translocation et d'internalisation des vésicules GluT4. Récemment il a en effet été démontré que l'altération de l'expression des protéines ESCRT dans les adipocytes était responsable, en plus de l'altération de la formation des endosomes multivésiculaires, d'une altération du trafic des vésicules GluT4 dans les cellules (Koumanov, Pereira et al. 2012)

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

## ► A

- Abusamra, A. J., Z. Zhong, et al. (2005). "Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 169-173.
- Ahle, S., A. Mann, et al. (1988). "Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane." EMBO J **7**(4): 919-929.
- Al-Nedawi, K., B. Meehan, et al. (2009). "Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression." Cell Cycle **8**(13): 2014-2018.
- Albinsson, S., Y. Suarez, et al. (2010). "MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(6): 1118-1126.
- Alkhateeb, H., A. Chabowski, et al. (2007). "Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(3): E783-793.
- Allagnat, F., F. Alonso, et al. (2008). "ICER-1gamma overexpression drives palmitate-mediated connexin36 down-regulation in insulin-secreting cells." J Biol Chem **283**(9): 5226-5234.
- Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, et al. (2011). "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes." Nat Biotechnol **29**(4): 341-345.
- Ambros, V. (2001). "microRNAs: tiny regulators with great potential." Cell **107**(7): 823-826.
- Ambros, V. and R. C. Lee (2004). "Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning." Methods Mol Biol **265**: 131-158.
- Aoki, N., S. Jin-no, et al. (2007). "Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles." Endocrinology **148**(8): 3850-3862.
- Aoki, N., R. Yokoyama, et al. (2010). "Adipocyte-derived microvesicles are associated with multiple angiogenic factors and induce angiogenesis in vivo and in vitro." Endocrinology **151**(6): 2567-2576.
- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, et al. (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 5003-5008.
- Atay, S., C. Gercel-Taylor, et al. (2011). "Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells." Exp Cell Res **317**(8): 1192-1202.

## ► B

- Babst, M. (2005). "A protein's final ESCRT." Traffic **6**(1): 2-9.
- Babst, M. (2011). "MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between." Curr Opin Cell Biol **23**(4): 452-457.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." Dev Cell **3**(2): 271-282.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." Dev Cell **3**(2): 283-289.
- Balaj, L., R. Lessard, et al. (2011). "Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences." Nat Commun **2**: 180.
- Balasubramanyam, M., S. Aravind, et al. (2011). "Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes." Mol Cell Biochem **351**(1-2): 197-205.



- Bang, C. and T. Thum (2012). "Exosomes: New players in cell-cell communication." Int J Biochem Cell Biol **44**(11): 2060-2064.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Batista, B. S., W. S. Eng, et al. (2011). "Identification of a conserved glycan signature for microvesicles." J Proteome Res **10**(10): 4624-4633.
- Benmerah, A., M. Bayrou, et al. (1999). "Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant." J Cell Sci **112** ( Pt 9): 1303-1311.
- Berditchevski, F. (2001). "Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye." J Cell Sci **114**(Pt 23): 4143-4151.
- Berditchevski, F. and E. Odintsova (1999). "Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling." J Cell Biol **146**(2): 477-492.
- Berditchevski, F. and E. Odintsova (2007). "Tetraspanins as regulators of protein trafficking." Traffic **8**(2): 89-96.
- Bianco, F., C. Perrotta, et al. (2009). "Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells." EMBO J **28**(8): 1043-1054.
- Bishop, N., A. Horman, et al. (2002). "Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates." J Cell Biol **157**(1): 91-101.
- Bishop, N. E. (2003). "Dynamics of endosomal sorting." Int Rev Cytol **232**: 1-57.
- Blanchard, N., D. Lankar, et al. (2002). "TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex." J Immunol **168**(7): 3235-3241.
- Blau, H. M., G. K. Pavlath, et al. (1985). "Plasticity of the differentiated state." Science **230**(4727): 758-766.
- Bobrie, A., M. Colombo, et al. (2011). "Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses." Traffic **12**(12): 1659-1668.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA **10**(2): 185-191.
- Bonifacino, J. S. and R. Rojas (2006). "Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(8): 568-579.
- Bortoluzzi, S., P. Scannapieco, et al. (2006). "Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome." Proteins **62**(3): 776-792.
- Boucheix, C. and E. Rubinstein (2001). "Tetraspanins." Cell Mol Life Sci **58**(9): 1189-1205.
- Bouzakri, K., P. Plomgaard, et al. (2011). "Bimodal effect on pancreatic beta-cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle." Diabetes **60**(4): 1111-1121.
- Bright, N. A., M. J. Gratian, et al. (2005). "Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells." Curr Biol **15**(4): 360-365.
- Bucci, C., R. G. Parton, et al. (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." Cell **70**(5): 715-728.
- Buckingham, M., L. Bajard, et al. (2003). "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." J Anat **202**(1): 59-68.
- Buckingham, M. and C. Desplan (2010). "Developmental mechanisms, patterning and evolution." Curr Opin Genet Dev **20**(4): 343-345.
- Buckingham, M. and D. Montarras (2008). "Skeletal muscle stem cells." Curr Opin Genet Dev **18**(4): 330-336.
- Buckingham, M. and S. D. Vincent (2009). "Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo." Curr Opin Genet Dev **19**(5): 444-453.

- Bunn, R. C., G. E. Cockrell, et al. (2010). "Palmitate and insulin synergistically induce IL-6 expression in human monocytes." Cardiovasc Diabetol **9**: 73.
- Burghoff, S., Z. Ding, et al. (2008). "Horizontal gene transfer from human endothelial cells to rat cardiomyocytes after intracoronary transplantation." Cardiovasc Res **77**(3): 534-543.
- Buschow, S. I., J. M. Liefhebber, et al. (2005). "Exosomes contain ubiquitinated proteins." Blood Cells Mol Dis **35**(3): 398-403.

## ► C

- Caby, M. P., D. Lankar, et al. (2005). "Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma." Int Immunol **17**(7): 879-887.
- Cai, X., C. H. Hagedorn, et al. (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10**(12): 1957-1966.
- Callis, T. E., J. F. Chen, et al. (2007). "MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development." DNA Cell Biol **26**(4): 219-225.
- Calzolari, A., C. Raggi, et al. (2006). "TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4486-4498.
- Camussi, G., M. C. Deregibus, et al. (2011). "Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells." Am J Cancer Res **1**(1): 98-110.
- Carafoli, E. (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1115-1122.
- Cardinali, B., L. Castellani, et al. (2009). "MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells." PLoS One **4**(10): e7607.
- Chairoungdua, A., D. L. Smith, et al. (2010). "Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling." J Cell Biol **190**(6): 1079-1091.
- Chaput, N., J. Taieb, et al. (2005). "The potential of exosomes in immunotherapy of cancer." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 111-115.
- Chaput, N. and C. Thery (2011). "Exosomes: immune properties and potential clinical implementations." Semin Immunopathol **33**(5): 419-440.
- Charlton, C. A., W. A. Mohler, et al. (2000). "Neural cell adhesion molecule (NCAM) and myoblast fusion." Dev Biol **221**(1): 112-119.
- Charrin, S., F. le Naour, et al. (2009). "Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web." Biochem J **420**(2): 133-154.
- Charrin, S., S. Manie, et al. (2002). "Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation." FEBS Lett **516**(1-3): 139-144.
- Charrin, S., S. Manie, et al. (2003). "A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins." Eur J Immunol **33**(9): 2479-2489.
- Chasserot-Golaz, S., N. Vitale, et al. (2005). "Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles." Mol Biol Cell **16**(3): 1108-1119.
- Chavez, J. A. and S. A. Summers (2003). "Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes." Arch Biochem Biophys **419**(2): 101-109.
- Chen, C. Z., L. Li, et al. (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." Science **303**(5654): 83-86.
- Chen, J. F., E. M. Mandel, et al. (2006). "The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation." Nat Genet **38**(2): 228-233.

- Chen, T., J. Guo, et al. (2011). "Chemokine-containing exosomes are released from heat-stressed tumor cells via lipid raft-dependent pathway and act as efficient tumor vaccine." J Immunol **186**(4): 2219-2228.
- Chiba, M., M. Kimura, et al. (2012). "Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines." Oncol Rep **28**(5): 1551-1558.
- Clayton, A., J. P. Mitchell, et al. (2007). "Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2." Cancer Res **67**(15): 7458-7466.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." Trends Cell Biol **19**(2): 43-51.
- Conde-Vancells, J., E. Rodriguez-Suarez, et al. (2008). "Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes." J Proteome Res **7**(12): 5157-5166.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis." J Cell Biol **162**(5): 773-779.
- Cornelison, D. D. (2008). "Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity." J Cell Biochem **105**(3): 663-669.
- Crist, C. G., D. Montarras, et al. (2009). "Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13383-13387.
- Crowther, R. A. and B. M. Pearse (1981). "Assembly and packing of clathrin into coats." J Cell Biol **91**(3 Pt 1): 790-797.
- Cullen, P. J. and P. J. Lockyer (2002). "Integration of calcium and Ras signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 339-348.

## ► D

- Damke, H., T. Baba, et al. (1995). "Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin." J Cell Biol **131**(1): 69-80.
- Daro, E., P. van der Sluijs, et al. (1996). "Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9559-9564.
- Davey, J. R., S. J. Humphrey, et al. (2012). "TBC1D13 is a RAB35 specific GAP that plays an important role in GLUT4 trafficking in adipocytes." Traffic **13**(10): 1429-1441.
- De Camilli, P., K. Takei, et al. (1995). "The function of dynamin in endocytosis." Curr Opin Neurobiol **5**(5): 559-565.
- de Gassart, A., C. Geminard, et al. (2004). "Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins?" Traffic **5**(11): 896-903.
- Deng, Z. B., A. Poliakov, et al. (2009). "Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance." Diabetes **58**(11): 2498-2505.
- Denli, A. M., B. B. Tops, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-235.
- Denzer, K., M. J. Kleijmeer, et al. (2000). "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3365-3374.
- Deo, A., J. Carlsson, et al. (2011). "How to choose a normalization strategy for miRNA quantitative real-time (qPCR) arrays." J Bioinform Comput Biol **9**(6): 795-812.

- Deregibus, M. C., V. Cantaluppi, et al. (2007). "Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA." Blood **110**(7): 2440-2448.
- Dikic, I. (2004). "ALIX-ing phospholipids with endosome biogenesis." Bioessays **26**(6): 604-607.
- Dimopoulos, N., M. Watson, et al. (2006). "Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells." Biochem J **399**(3): 473-481.
- Ding, L. and M. Han (2007). "GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing." Trends Cell Biol **17**(8): 411-416.
- Ding, L., A. Spencer, et al. (2005). "The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*." Mol Cell **19**(4): 437-447.
- Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902.
- Drummond, M. J., J. J. McCarthy, et al. (2008). "Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(6): E1333-1340.

## ► E

- Eisenberg, I., M. S. Alexander, et al. (2009). "miRNAs in normal and diseased skeletal muscle." J Cell Mol Med **13**(1): 2-11.
- Eldh, M., J. Lotvall, et al. (2012). "Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods." Mol Immunol **50**(4): 278-286.
- Escrevente, C., S. Keller, et al. (2011). "Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells." BMC Cancer **11**: 108.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 9-22.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay." Nat Struct Mol Biol **15**(4): 346-353.

## ► F

- Fader, C. M., A. Savina, et al. (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): 153-157.
- Falguieres, T., P. P. Luyet, et al. (2008). "In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101." Mol Biol Cell **19**(11): 4942-4955.
- Falguieres, T., P. P. Luyet, et al. (2009). "Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics." Exp Cell Res **315**(9): 1567-1573.
- Feng, D., W. L. Zhao, et al. (2010). "Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis." Traffic **11**(5): 675-687.
- Fernandez-Borja, M., R. Wubbolts, et al. (1999). "Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity." Curr Biol **9**(1): 55-58.
- Fevrier, B. and G. Raposo (2004). "Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 415-421.

- Fevrier, B., D. Vilette, et al. (2005). "Exosomes: a bubble ride for prions?" Traffic **6**(1): 10-17.
- Fitzner, D., M. Schnaars, et al. (2011). "Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis." J Cell Sci **124**(Pt 3): 447-458.
- Freyssinet, J. M. (2003). "Cellular microparticles: what are they bad or good for?" J Thromb Haemost **1**(7): 1655-1662.
- Friel, A. M., C. Corcoran, et al. (2010). "Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **123**(3): 613-625.
- Fulco, M., R. L. Schiltz, et al. (2003). "Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state." Mol Cell **12**(1): 51-62.
- Futter, C. E. and I. J. White (2007). "Annexins and endocytosis." Traffic **8**(8): 951-958.

## ► G

- Galbiati, F., B. Razani, et al. (2001). "Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy." Trends Mol Med **7**(10): 435-441.
- Galvez, T., J. Gilleron, et al. (2012). "SnapShot: Mammalian Rab Proteins in Endocytic Trafficking." Cell **151**(1): 234-234 e232.
- Gastpar, R., M. Gehrmann, et al. (2005). "Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells." Cancer Res **65**(12): 5238-5247.
- Ge, X., C. McFarlane, et al. (2011). "Smad3 signaling is required for satellite cell function and myogenic differentiation of myoblasts." Cell Res **21**(11): 1591-1604.
- Ge, Y. and J. Chen (2011). "MicroRNAs in skeletal myogenesis." Cell Cycle **10**(3): 441-448.
- Gerke, V., C. E. Creutz, et al. (2005). "Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 449-461.
- Gerke, V. and S. E. Moss (2002). "Annexins: from structure to function." Physiol Rev **82**(2): 331-371.
- Geuze, H. J., J. W. Slot, et al. (1987). "Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution." J Cell Biol **104**(6): 1715-1723.
- Gibbins, D. J., C. Ciaudo, et al. (2009). "Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity." Nat Cell Biol **11**(9): 1143-1149.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, et al. (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." EMBO J **19**(17): 4577-4588.
- Gould, S. J., A. M. Booth, et al. (2003). "The Trojan exosome hypothesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10592-10597.
- Grabowska, I., A. Szeliga, et al. (2011). "Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression." Cell Biol Int **35**(2): 125-133.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**(7014): 235-240.
- Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, et al. (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D154-158.
- Gruenberg, J. (2003). "Lipids in endocytic membrane transport and sorting." Curr Opin Cell Biol **15**(4): 382-388.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, et al. (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): 1301-1316.

- Gruenberg, J. and F. R. Maxfield (1995). "Membrane transport in the endocytic pathway." Curr Opin Cell Biol **7**(4): 552-563.
- Gruenberg, J. and H. Stenmark (2004). "The biogenesis of multivesicular endosomes." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(4): 317-323.
- Gu, M., W. Wang, et al. (1994). "Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation." J Cell Sci **107** ( Pt 1): 175-181.
- Guescini, M., D. Guidolin, et al. (2010). "C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction." Exp Cell Res **316**(12): 1977-1984.
- Gyorgy, B., T. G. Szabo, et al. (2011). "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles." Cell Mol Life Sci **68**(16): 2667-2688.

## ► H

- Han, J., Y. Lee, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-3027.
- Hansen, C. G. and B. J. Nichols (2010). "Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae." Trends Cell Biol **20**(4): 177-186.
- Hanson, P. I., S. Shim, et al. (2009). "Cell biology of the ESCRT machinery." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 568-574.
- Harding, C., J. Heuser, et al. (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." J Cell Biol **97**(2): 329-339.
- Haugen, F., F. Norheim, et al. (2010). "IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **298**(4): C807-816.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.
- Heijnen, H. F., A. E. Schiel, et al. (1999). "Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules." Blood **94**(11): 3791-3799.
- Hemler, M. E. (2003). "Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 397-422.
- Hemler, M. E. (2005). "Tetraspanin functions and associated microdomains." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(10): 801-811.
- Henderson, M. C. and D. O. Azorsa (2012). "The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes." Front Oncol **2**: 38.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich, et al. (2011). "The ESCRT pathway." Dev Cell **21**(1): 77-91.
- Henningsen, J., K. T. Rigbolt, et al. (2010). "Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation." Mol Cell Proteomics **9**(11): 2482-2496.
- Hergenreider, E., S. Heydt, et al. (2012). "Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs." Nat Cell Biol **14**(3): 249-256.
- Hicke, L. (1999). "Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels." Trends Cell Biol **9**(3): 107-112.
- Hobert, O. (2004). "Common logic of transcription factor and microRNA action." Trends Biochem Sci **29**(9): 462-468.
- Hoepfner, S., F. Severin, et al. (2005). "Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B." Cell **121**(3): 437-450.

- Hoffman, E. A., K. M. Perkumas, et al. (2009). "Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(3): 1313-1318.
- Holstein, S. E., H. Ungewickell, et al. (1996). "Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin." J Cell Biol **135**(4): 925-937.
- Honda, A., M. Nogami, et al. (1999). "Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation." Cell **99**(5): 521-532.
- Horsley, V., K. M. Jansen, et al. (2003). "IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth." Cell **113**(4): 483-494.
- Hosseini-Beheshti, E., S. Pham, et al. (2012). "Exosomes as Biomarker Enriched Microvesicles: Characterization of Exosomal Proteins derived from a Panel of Prostate Cell Lines with distinct AR phenotypes." Mol Cell Proteomics.
- Hsu, C., Y. Morohashi, et al. (2010). "Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C." J Cell Biol **189**(2): 223-232.
- Hu, G., K. M. Drescher, et al. (2012). "Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential." Front Genet **3**: 56.
- Huet, C., J. F. Ash, et al. (1980). "The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts." Cell **21**(2): 429-438.
- Huotari, J. and A. Helenius (2011). "Endosome maturation." EMBO J **30**(17): 3481-3500.
- Hurley, J. H. and P. I. Hanson (2010). "Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(8): 556-566.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.

## ► J

- Jahn, R., T. Lang, et al. (2003). "Membrane fusion." Cell **112**(4): 519-533.
- Jakymiw, A., S. Lian, et al. (2005). "Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference." Nat Cell Biol **7**(12): 1267-1274.
- Jiang, R., B. Gao, et al. (2000). "Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes." J Biol Chem **275**(12): 8439-8447.
- Johnson, L. S., K. W. Dunn, et al. (1993). "Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif." Mol Biol Cell **4**(12): 1251-1266.
- Johnstone, R. M. (2005). "Revisiting the road to the discovery of exosomes." Blood Cells Mol Dis **34**(3): 214-219.
- Johnstone, R. M. (2006). "Exosomes biological significance: A concise review." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 315-321.
- Johnstone, R. M., M. Adam, et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-9420.
- Johnstone, R. M., A. Bianchini, et al. (1989). "Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions." Blood **74**(5): 1844-1851.
- Joulia-Ekaza, D. and G. Cabello (2006). "Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects." Exp Cell Res **312**(13): 2401-2414.

## ►K

- Kaddai, V., Y. Le Marchand-Brustel, et al. (2008). "Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking." *Acta Physiol (Oxf)* **192**(1): 75-88.
- Karolina, D. S., A. Armugam, et al. (2011). "MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus." *PLoS One* **6**(8): e22839.
- Katzmann, D. J., M. Babst, et al. (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." *Cell* **106**(2): 145-155.
- Keller, S., M. P. Sanderson, et al. (2006). "Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function." *Immunol Lett* **107**(2): 102-108.
- Kewalramani, G., L. N. Fink, et al. (2011). "Palmitate-activated macrophages confer insulin resistance to muscle cells by a mechanism involving protein kinase C theta and epsilon." *PLoS One* **6**(10): e26947.
- Kharaziha, P., S. Ceder, et al. (2012). "Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle." *Biochim Biophys Acta* **1826**(1): 103-111.
- Khvorova, A., A. Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell* **115**(2): 209-216.
- Kirchhausen, T. (2000). "Three ways to make a vesicle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 187-198.
- Kislinger, T., A. O. Gramolini, et al. (2005). "Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation." *Mol Cell Proteomics* **4**(7): 887-901.
- Kitzmann, M. and A. Fernandez (2001). "Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts." *Cell Mol Life Sci* **58**(4): 571-579.
- Kleijmeer, M., G. Ramm, et al. (2001). "Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells." *J Cell Biol* **155**(1): 53-63.
- Kobayashi, T., M. H. Beuchat, et al. (1999). "Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport." *Nat Cell Biol* **1**(2): 113-118.
- Kogure, T., W. L. Lin, et al. (2011). "Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth." *Hepatology* **54**(4): 1237-1248.
- Komander, D., M. J. Clague, et al. (2009). "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8): 550-563.
- Kooijmans, S. A., P. Vader, et al. (2012). "Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems." *Int J Nanomedicine* **7**: 1525-1541.
- Kosaka, N., H. Iguchi, et al. (2010). "Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis." *Cancer Sci* **101**(10): 2087-2092.
- Kosaka, N., H. Iguchi, et al. (2010). "Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells." *J Biol Chem* **285**(23): 17442-17452.
- Kosaka, N. and T. Ochiya (2011). "Unraveling the Mystery of Cancer by Secretory microRNA: Horizontal microRNA Transfer between Living Cells." *Front Genet* **2**: 97.
- Koumanov, F., V. J. Pereira, et al. (2012). "GLUT4 traffic through an ESCRT-III-dependent sorting compartment in adipocytes." *PLoS One* **7**(9): e44141.
- Koutsoulidou, A., N. P. Mastroiannopoulos, et al. (2011). "Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle." *BMC Dev Biol* **11**: 34.



► L

- Lai, R. C., F. Arslan, et al. (2010). "Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury." Stem Cell Res **4**(3): 214-222.
- Lakadamyali, M., M. J. Rust, et al. (2006). "Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes." Cell **124**(5): 997-1009.
- Lakkaraju, A. and E. Rodriguez-Boulan (2008). "Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity." Trends Cell Biol **18**(5): 199-209.
- Lamparski, H. G., A. Metha-Damani, et al. (2002). "Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells." J Immunol Methods **270**(2): 211-226.
- Landthaler, M., A. Yalcin, et al. (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." Curr Biol **14**(23): 2162-2167.
- Lanner, J. T., J. D. Bruton, et al. (2008). "Ca(2+) and insulin-mediated glucose uptake." Curr Opin Pharmacol **8**(3): 339-345.
- Lata, S., G. Schoehn, et al. (2009). "Structure and function of ESCRT-III." Biochem Soc Trans **37**(Pt 1): 156-160.
- Laulagnier, K., D. Grand, et al. (2004). "PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes." FEBS Lett **572**(1-3): 11-14.
- Laulagnier, K., C. Motta, et al. (2004). "Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization." Biochem J **380**(Pt 1): 161-171.
- Le Naour, F., M. Andre, et al. (2006). "Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts." Proteomics **6**(24): 6447-6454.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., S. El Andaloussi, et al. (2012). "Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy." Hum Mol Genet.
- Lee, Y., K. Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." EMBO J **21**(17): 4663-4670.
- Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.
- Lee, Y. S., S. Pressman, et al. (2009). "Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking." Nat Cell Biol **11**(9): 1150-1156.
- Levy, S. and T. Shoham (2005). "Protein-protein interactions in the tetraspanin web." Physiology (Bethesda) **20**: 218-224.
- Levy, S. and T. Shoham (2005). "The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes." Nat Rev Immunol **5**(2): 136-148.
- Liu, C., S. Yu, et al. (2006). "Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function." J Immunol **176**(3): 1375-1385.
- Liu, J., D. J. Burkin, et al. (2008). "Increasing alpha 7 beta 1-integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression." Am J Physiol Cell Physiol **294**(2): C627-640.
- Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-1441.
- Liu, J., F. V. Rivas, et al. (2005). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." Nat Cell Biol **7**(12): 1261-1266.

- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, et al. (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-723.
- Logozzi, M., A. De Milito, et al. (2009). "High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients." *PLoS One* **4**(4): e5219.
- Lombardi, D., T. Soldati, et al. (1993). "Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network." *EMBO J* **12**(2): 677-682.
- Losche, W., T. Scholz, et al. (2004). "Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils." *Platelets* **15**(2): 109-115.
- Ludwig, A. K. and B. Giebel (2012). "Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication." *Int J Biochem Cell Biol* **44**(1): 11-15.
- Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* **303**(5654): 95-98.
- Luzio, J. P., B. A. Rous, et al. (2000). "Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis." *J Cell Sci* **113** ( Pt 9): 1515-1524.

## ► M

- Maecker, H. T., S. C. Todd, et al. (1997). "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators." *FASEB J* **11**(6): 428-442.
- Marechal, V., M. C. Prevost, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis." *J Virol* **75**(22): 11166-11177.
- Marleau, A. M., C. S. Chen, et al. (2012). "Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer." *J Transl Med* **10**(1): 134.
- Masyuk, A. I., B. Q. Huang, et al. (2010). "Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**(4): G990-999.
- Mathivanan, S., C. J. Fahner, et al. (2012). "ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids." *Nucleic Acids Res* **40**(Database issue): D1241-1244.
- Mathivanan, S., H. Ji, et al. (2010). "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." *J Proteomics* **73**(10): 1907-1920.
- Mathivanan, S., J. W. Lim, et al. (2010). "Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature." *Mol Cell Proteomics* **9**(2): 197-208.
- Mathivanan, S. and R. J. Simpson (2009). "ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA." *Proteomics* **9**(21): 4997-5000.
- Matsuo, H., J. Chevallier, et al. (2004). "Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization." *Science* **303**(5657): 531-534.
- Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2): 121-132.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8): 603-612.
- McCarthy, J. J. (2008). "MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR." *Biochim Biophys Acta* **1779**(11): 682-691.
- McNally, E. M., E. de Sa Moreira, et al. (1998). "Caveolin-3 in muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **7**(5): 871-877.
- Mears, R., R. A. Craven, et al. (2004). "Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry." *Proteomics* **4**(12): 4019-4031.
- Meckes, D. G., Jr. and N. Raab-Traub (2011). "Microvesicles and viral infection." *J Virol* **85**(24): 12844-12854.

- Meister, G., M. Landthaler, et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." *Mol Cell* **15**(2): 185-197.
- Mesaki, K., K. Tanabe, et al. (2011). "Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement." *PLoS One* **6**(5): e19764.
- Miaczynska, M., S. Christoforidis, et al. (2004). "APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment." *Cell* **116**(3): 445-456.
- Michelet, X., A. Djeddi, et al. (2010). "Developmental and cellular functions of the ESCRT machinery in pluricellular organisms." *Biol Cell* **102**(3): 191-202.
- Mills, I. G., A. T. Jones, et al. (1999). "Regulation of endosome fusion." *Mol Membr Biol* **16**(1): 73-79.
- Mitchell, P. J., J. Welton, et al. (2009). "Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer?" *J Transl Med* **7**: 4.
- Mittelbrunn, M., C. Gutierrez-Vazquez, et al. (2011). "Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells." *Nat Commun* **2**: 282.
- Miyanishi, M., K. Tada, et al. (2007). "Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor." *Nature* **450**(7168): 435-439.
- Mobius, W., E. van Donselaar, et al. (2003). "Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway." *Traffic* **4**(4): 222-231.
- Montecalvo, A., A. T. Larregina, et al. (2012). "Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes." *Blood* **119**(3): 756-766.
- Morel, O., L. Jesel, et al. (2011). "Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(1): 15-26.
- Morelli, A. E., A. T. Larregina, et al. (2004). "Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells." *Blood* **104**(10): 3257-3266.
- Mori, M., H. Nakagami, et al. (2012). "Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells." *PLoS Biol* **10**(4): e1001314.
- Mukherjee, S. and F. R. Maxfield (1999). "Cholesterol: stuck in traffic." *Nat Cell Biol* **1**(2): E37-38.
- Mukherjee, S. and F. R. Maxfield (2004). "Membrane domains." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 839-866.
- Muller, G., M. Schneider, et al. (2011). "Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis." *Cell Signal* **23**(7): 1207-1223.
- Muller, G., M. Schneider, et al. (2011). "Upregulation of lipid synthesis in small rat adipocytes by microvesicle-associated CD73 from large adipocytes." *Obesity (Silver Spring)* **19**(8): 1531-1544.
- Murk, J. L., W. Stoorvogel, et al. (2002). "The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation." *Semin Cell Dev Biol* **13**(4): 303-311.
- Mylona, E., K. A. Jones, et al. (2006). "CD44 regulates myoblast migration and differentiation." *J Cell Physiol* **209**(2): 314-321.
- Naguibneva, I., M. Ameyar-Zazoua, et al. (2006). "The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation." *Nat Cell Biol* **8**(3): 278-284.

## ► N

- Nokes, R. L., I. C. Fields, et al. (2008). "Rab13 regulates membrane trafficking between TGN and recycling endosomes in polarized epithelial cells." *J Cell Biol* **182**(5): 845-853.

Nolte-'t Hoen, E. N., S. I. Buschow, et al. (2009). "Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1." Blood **113**(9): 1977-1981.

## ► O

Ogawa, R., C. Tanaka, et al. (2010). "Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation." Biochem Biophys Res Commun **398**(4): 723-729.

Ohno, H., J. Stewart, et al. (1995). "Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins." Science **269**(5232): 1872-1875.

Okada, C., E. Yamashita, et al. (2009). "A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery." Science **326**(5957): 1275-1279.

Ostrowski, M., N. B. Carmo, et al. (2010). "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway." Nat Cell Biol **12**(1): 19-30; sup pp 11-13.

## ► P

Palade, G. E. (1955). "Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ." J Biophys Biochem Cytol **1**(6): 567-582.

Pant, S., H. Hilton, et al. (2012). "The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities." Biochem Pharmacol **83**(11): 1484-1494.

Papini, E., B. Satin, et al. (1997). "The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by Helicobacter pylori cytotoxin." EMBO J **16**(1): 15-24.

Parolini, I., C. Federici, et al. (2009). "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells." J Biol Chem **284**(49): 34211-34222.

Pearse, B. M. (1975). "Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization." J Mol Biol **97**(1): 93-98.

Pearse, B. M. and M. S. Robinson (1984). "Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin." EMBO J **3**(9): 1951-1957.

Pegtel, D. M., K. Cosmopoulos, et al. (2010). "Functional delivery of viral miRNAs via exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6328-6333.

Pelchen-Matthews, A., G. Raposo, et al. (2004). "Endosomes, exosomes and Trojan viruses." Trends Microbiol **12**(7): 310-316.

Pelkmans, L., T. Burli, et al. (2004). "Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic." Cell **118**(6): 767-780.

Peng, P., Y. Yan, et al. (2011). "Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity." Oncol Rep **25**(3): 749-762.

Pfeffer, S. R. (1999). "Motivating endosome motility." Nat Cell Biol **1**(6): E145-147.

Pfeffer, S. R. (2010). "Two Rabs for exosome release." Nat Cell Biol **12**(1): 3-4.

Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al. (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." Science **309**(5740): 1573-1576.

Piper, R. C. and D. J. Katzmann (2007). "Biogenesis and function of multivesicular bodies." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 519-547.

Piper, R. C. and P. J. Lehner (2011). "Endosomal transport via ubiquitination." Trends Cell Biol **21**(11): 647-655.

Piper, R. C. and J. P. Luzio (2001). "Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies." Traffic **2**(9): 612-621.

- Platta, H. W. and H. Stenmark (2011). "Endocytosis and signaling." Curr Opin Cell Biol **23**(4): 393-403.
- Posey, A. D., Jr., P. Pytel, et al. (2011). "Endocytic recycling proteins EHD1 and EHD2 interact with fer-1-like-5 (Fer1L5) and mediate myoblast fusion." J Biol Chem **286**(9): 7379-7388.
- Pryor, P. R., B. M. Mullock, et al. (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): 1053-1062.

## ► Q

- Qu, J. L., X. J. Qu, et al. (2009). "Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation." Dig Liver Dis **41**(12): 875-880.
- Qu, Y. and G. R. Dubyak (2009). "P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways." Purinergic Signal **5**(2): 163-173.
- Quesenberry, P. J. and J. M. Aliotta (2010). "Cellular phenotype switching and microvesicles." Adv Drug Deliv Rev **62**(12): 1141-1148.

## ► R

- Rabinowits, G., C. Gercel-Taylor, et al. (2009). "Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer." Clin Lung Cancer **10**(1): 42-46.
- Raiborg, C. and H. Stenmark (2009). "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins." Nature **458**(7237): 445-452.
- Rana, S., S. Yue, et al. (2012). "Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection." Int J Biochem Cell Biol **44**(9): 1574-1584.
- Rana, S. and M. Zoller (2011). "Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis." Biochem Soc Trans **39**(2): 559-562.
- Rani, S., K. O'Brien, et al. (2011). "Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling." Methods Mol Biol **784**: 181-195.
- Rao, P. K., R. M. Kumar, et al. (2006). "Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8721-8726.
- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J Exp Med **183**(3): 1161-1172.
- Ratajczak, J., M. Wysoczynski, et al. (2006). "Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication." Leukemia **20**(9): 1487-1495.
- Rathbone, C. R., F. W. Booth, et al. (2009). "Sirt1 increases skeletal muscle precursor cell proliferation." Eur J Cell Biol **88**(1): 35-44.
- Rautou, P. E., A. C. Vion, et al. (2011). "Microparticles, vascular function, and atherothrombosis." Circ Res **109**(5): 593-606.
- Razi, M. and C. E. Futter (2006). "Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation." Mol Biol Cell **17**(8): 3469-3483.
- Rechavi, O., Y. Erlich, et al. (2009). "Cell contact-dependent acquisition of cellular and viral nonautonomously encoded small RNAs." Genes Dev **23**(16): 1971-1979.
- Record, M., C. Subra, et al. (2011). "Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors." Biochem Pharmacol **81**(10): 1171-1182.

- Rehwinkel, J., I. Behm-Ansmant, et al. (2005). "A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing." RNA **11**(11): 1640-1647.
- Rink, J., E. Ghigo, et al. (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." Cell **122**(5): 735-749.
- Robinson, M. S. (1987). "Coated vesicles and protein sorting." J Cell Sci **87 ( Pt 2)**: 203-204.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res **14**(10A): 1902-1910.
- Rogaev, E. I., S. A. Borinskaia, et al. (2008). "[Human microRNA in norm and pathology]." Mol Biol (Mosk) **42**(5): 751-764.
- Roth, T. F. and K. R. Porter (1964). "Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L." J Cell Biol **20**: 313-332.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-682.
- Rupp, A. K., C. Rupp, et al. (2011). "Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage." Gynecol Oncol **122**(2): 437-446.
- Russo, G. and A. Giordano (2009). "miRNAs: from biogenesis to networks." Methods Mol Biol **563**: 303-352.
- Rusten, T. E., T. Vaccari, et al. (2012). "Shaping development with ESCRTs." Nat Cell Biol **14**(1): 38-45.

## ►S

- Saccone, V. and P. L. Puri (2010). "Epigenetic regulation of skeletal myogenesis." Organogenesis **6**(1): 48-53.
- Sahoo, S., E. Klychko, et al. (2011). "Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity." Circ Res **109**(7): 724-728.
- Saini, A., N. Al-Shanti, et al. (2012). "Sirtuin 1 regulates skeletal myoblast survival and enhances differentiation in the presence of resveratrol." Exp Physiol **97**(3): 400-418.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones, et al. (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(45): 17719-17724.
- Salaun, C., J. Greaves, et al. (2010). "The intracellular dynamic of protein palmitoylation." J Cell Biol **191**(7): 1229-1238.
- Santos, J. M., S. B. Ribeiro, et al. (2008). "Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake." Int J Sports Med **29**(10): 785-794.
- Savina, A., C. M. Fader, et al. (2005). "Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner." Traffic **6**(2): 131-143.
- Savina, A., M. Furlan, et al. (2003). "Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells." J Biol Chem **278**(22): 20083-20090.
- Savina, A., M. Vidal, et al. (2002). "The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11." J Cell Sci **115**(Pt 12): 2505-2515.
- Sayed, D. and M. Abdellatif (2011). "MicroRNAs in development and disease." Physiol Rev **91**(3): 827-887.
- Schmitz-Peiffer, C., D. L. Craig, et al. (1999). "Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate." J Biol Chem **274**(34): 24202-24210.
- Schorey, J. S. and S. Bhatnagar (2008). "Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology." Traffic **9**(6): 871-881.
- Schwander, M., M. Leu, et al. (2003). "Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly." Dev Cell **4**(5): 673-685.

- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Segura, E., S. Amigorena, et al. (2005). "Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 89-93.
- Seitz, H. and P. D. Zamore (2006). "Rethinking the microprocessor." Cell **125**(5): 827-829.
- Sen, G. L. and H. M. Blau (2005). "Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies." Nat Cell Biol **7**(6): 633-636.
- Serru, V., P. Dessen, et al. (2000). "Sequence and expression of seven new tetraspans." Biochim Biophys Acta **1478**(1): 159-163.
- Sherr, C. J. (1995). "D-type cyclins." Trends Biochem Sci **20**(5): 187-190.
- Shields, S. B. and R. C. Piper (2011). "How ubiquitin functions with ESCRTs." Traffic **12**(10): 1306-1317.
- Shin, C., J. W. Nam, et al. (2010). "Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing." Mol Cell **38**(6): 789-802.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." J Clin Invest **116**(7): 1793-1801.
- Silverman, J. M. and N. E. Reiner (2011). "Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes." Cell Microbiol **13**(1): 1-9.
- Silvie, O., S. Charrin, et al. (2006). "Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites." J Cell Sci **119**(Pt 10): 1992-2002.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-39.
- Simons, M. and G. Raposo (2009). "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 575-581.
- Simonsen, A., A. E. Wurmser, et al. (2001). "The role of phosphoinositides in membrane transport." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 485-492.
- Simpson, R. J., S. S. Jensen, et al. (2008). "Proteomic profiling of exosomes: current perspectives." Proteomics **8**(19): 4083-4099.
- Simpson, R. J., J. W. Lim, et al. (2009). "Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential." Expert Rev Proteomics **6**(3): 267-283.
- Siomi, H. and M. C. Siomi (2009). "RISC hitches onto endosome trafficking." Nat Cell Biol **11**(9): 1049-1051.
- Skog, J., T. Wurdinger, et al. (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." Nat Cell Biol **10**(12): 1470-1476.
- Skokos, D., S. Le Panse, et al. (2001). "Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes." J Immunol **166**(2): 868-876.
- Soldati, T. and M. Schliwa (2006). "Powering membrane traffic in endocytosis and recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 897-908.
- Somasundaram, R. and M. Herlyn (2012). "Melanoma exosomes: messengers of metastasis." Nat Med **18**(6): 853-854.
- Sotelo, J. R. and K. R. Porter (1959). "An electron microscope study of the rat ovum." J Biophys Biochem Cytol **5**(2): 327-342.
- Staubach, S., H. Razawi, et al. (2009). "Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7." Proteomics **9**(10): 2820-2835.

- Stefani, G. and F. J. Slack (2008). "Small non-coding RNAs in animal development." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 219-230.
- Stenmark, H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 513-525.
- Stipp, C. S., T. V. Kolesnikova, et al. (2003). "Functional domains in tetraspanin proteins." Trends Biochem Sci **28**(2): 106-112.
- Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, et al. (2002). "The biogenesis and functions of exosomes." Traffic **3**(5): 321-330.
- Strous, G. J. and R. Govers (1999). "The ubiquitin-proteasome system and endocytosis." J Cell Sci **112** ( Pt **10**): 1417-1423.
- Stuffers, S., A. Brech, et al. (2009). "ESCRT proteins in physiology and disease." Exp Cell Res **315**(9): 1619-1626.
- Subra, C., D. Grand, et al. (2010). "Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins." J Lipid Res **51**(8): 2105-2120.
- Subra, C., K. Laulagnier, et al. (2007). "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies." Biochimie **89**(2): 205-212.
- Sun, Y., P. J. Bilan, et al. (2010). "Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(46): 19909-19914.
- Sverdlov, E. D. (2012). "Amedeo Avogadro's cry: What is 1 microg of exosomes?" Bioessays.

## ► T

- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." Gynecol Oncol **110**(1): 13-21.
- Thery, C. (2011). "Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications." F1000 Biol Rep **3**: 15.
- Thery, C., S. Amigorena, et al. (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 22.
- Thery, C., M. Boussac, et al. (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." J Immunol **166**(12): 7309-7318.
- Thery, C., M. Ostrowski, et al. (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." Nat Rev Immunol **9**(8): 581-593.
- Thery, C., A. Regnault, et al. (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J Cell Biol **147**(3): 599-610.
- Thery, C., L. Zitvogel, et al. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-579.
- Tian, T., Y. Wang, et al. (2010). "Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy." J Cell Biochem **111**(2): 488-496.
- Todd, S. C., V. S. Doctor, et al. (1998). "Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family." Biochim Biophys Acta **1399**(1): 101-104.
- Trajkovic, K., C. Hsu, et al. (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-1247.
- Trams, E. G., C. J. Lauter, et al. (1981). "Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles." Biochim Biophys Acta **645**(1): 63-70.



## ► U

- Ullrich, O., S. Reinsch, et al. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." J Cell Biol **135**(4): 913-924.
- Umez, T., K. Ohyashiki, et al. (2012). "Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs." Oncogene.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, et al. (1997). "Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide- and substrate-binding modules of Hsc70." J Biol Chem **272**(31): 19594-19600.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, et al. (1995). "Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles." Nature **378**(6557): 632-635.
- Ussher, J. R., C. D. Folmes, et al. (2012). "Inhibition of serine palmitoyl transferase I reduces cardiac ceramide levels and increases glycolysis rates following diet-induced insulin resistance." PLoS One **7**(5): e37703.

## ► V

- Valadi, H., K. Ekstrom, et al. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.
- Valapala, M. and J. K. Vishwanatha (2011). "Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2." J Biol Chem **286**(35): 30911-30925.
- Valdez, M. R., J. A. Richardson, et al. (2000). "Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4." Dev Biol **219**(2): 287-298.
- Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, et al. (2006). "Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs." Genes Dev **20**(5): 515-524.
- van der Goot, F. G. and J. Gruenberg (2006). "Intra-endosomal membrane traffic." Trends Cell Biol **16**(10): 514-521.
- van der Sluijs, P., M. Hull, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway." Cell **70**(5): 729-740.
- van Dommelen, S. M., P. Vader, et al. (2012). "Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery." J Control Release **161**(2): 635-644.
- van Meel, E. and J. Klumperman (2008). "Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system." Histochem Cell Biol **129**(3): 253-266.
- van Niel, G., I. Porto-Carreiro, et al. (2006). "Exosomes: a common pathway for a specialized function." J Biochem **140**(1): 13-21.
- van Niel, G., G. Raposo, et al. (2001). "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles." Gastroenterology **121**(2): 337-349.
- Vella, L. J., R. A. Sharples, et al. (2007). "Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing." J Pathol **211**(5): 582-590.
- Veron, P., E. Segura, et al. (2005). "Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 81-88.
- Verweij, F. J., J. M. Middeldorp, et al. (2012). "Intracellular signaling controlled by the endosomal-exosomal pathway." Commun Integr Biol **5**(1): 88-93.
- Viaud, S., M. Terme, et al. (2009). "Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha." PLoS One **4**(3): e4942.
- Vickers, K. C. and A. T. Remaley (2012). "Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication." Curr Opin Lipidol **23**(2): 91-97.

- Vinten, J., A. H. Johnsen, et al. (2005). "Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae." *Biochim Biophys Acta* **1717**(1): 34-40.
- Vinten, J., M. Voldstedlund, et al. (2001). "A 60-kDa protein abundant in adipocyte caveolae." *Cell Tissue Res* **305**(1): 99-106.
- Vlassov, A. V., S. Magdaleno, et al. (2012). "Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials." *Biochim Biophys Acta* **1820**(7): 940-948.
- Von Bartheld, C. S. and A. L. Altick (2011). "Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions." *Prog Neurobiol* **93**(3): 313-340.
- Vonderheit, A. and A. Helenius (2005). "Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes." *PLoS Biol* **3**(7): e233.

## ► W

- Wang, G., M. Dinkins, et al. (2012). "Astrocytes Secrete Exosomes Enriched with Proapoptotic Ceramide and Prostate Apoptosis Response 4 (PAR-4): POTENTIAL MECHANISM OF APOPTOSIS INDUCTION IN ALZHEIMER DISEASE (AD)." *J Biol Chem* **287**(25): 21384-21395.
- Wang, K., S. Zhang, et al. (2010). "Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **38**(20): 7248-7259.
- Wang, W., L. Yang, et al. (2007). "Evidence of cholesterol accumulated in high curvature regions: implication to the curvature elastic energy for lipid mixtures." *Biophys J* **92**(8): 2819-2830.
- Watarai, M., I. Derre, et al. (2001). "Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus." *J Exp Med* **194**(8): 1081-1096.
- Watts, C. (1997). "Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules." *Annu Rev Immunol* **15**: 821-850.
- Webber, J., R. Steadman, et al. (2010). "Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation." *Cancer Res* **70**(23): 9621-9630.
- Weigert, C., K. Brodbeck, et al. (2004). "Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB." *J Biol Chem* **279**(23): 23942-23952.
- Williams, A. H., N. Liu, et al. (2009). "MicroRNA control of muscle development and disease." *Curr Opin Cell Biol* **21**(3): 461-469.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2004). "The Caveolin genes: from cell biology to medicine." *Ann Med* **36**(8): 584-595.
- Wong, C. F. and R. L. Tellam (2008). "MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis." *J Biol Chem* **283**(15): 9836-9843.
- Woodman, P. G. and C. E. Futter (2008). "Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity." *Curr Opin Cell Biol* **20**(4): 408-414.
- Wubbolts, R., M. Fernandez-Borja, et al. (1996). "Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface." *J Cell Biol* **135**(3): 611-622.
- Wubbolts, R., R. S. Leckie, et al. (2003). "Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation." *J Biol Chem* **278**(13): 10963-10972.

## ► X

Xu, J., W. Wu, et al. (2012). "The Role of MicroRNA-146a in the Pathogenesis of the Diabetic Wound-Healing Impairment: Correction With Mesenchymal Stem Cell Treatment." Diabetes **61**(11): 2906-2912.

## ► Y

Yaffe, D. (1968). "Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **61**(2): 477-483.

Yaffe, D. and O. Saxel (1977). "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle." Nature **270**(5639): 725-727.

Yamakuchi, M. (2012). "MicroRNA Regulation of SIRT1." Front Physiol **3**: 68.

Yanez-Mo, M., O. Barreiro, et al. (2009). "Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes." Trends Cell Biol **19**(9): 434-446.

Yang, C. and P. D. Robbins (2011). "The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis." Clin Dev Immunol **2011**: 842849.

Yang, X., C. Claas, et al. (2002). "Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology." Mol Biol Cell **13**(3): 767-781.

Yang, X., O. V. Kovalenko, et al. (2004). "Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes." J Cell Biol **167**(6): 1231-1240.

Yekta, S., I. H. Shih, et al. (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." Science **304**(5670): 594-596.

Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.

Yoon, J. H., J. Kim, et al. (2012). "Secretomics for skeletal muscle cells: a discovery of novel regulators?" Adv Biol Regul **52**(2): 340-350.

Yu, S., C. Liu, et al. (2007). "Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells." J Immunol **178**(11): 6867-6875.

Yunta, M. and P. A. Lazo (2003). "Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes." Cell Signal **15**(6): 559-564.

Yuyama, K., H. Sun, et al. (2012). "Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid-beta by Microglia." J Biol Chem **287**(14): 10977-10989.

## ► Z

Zeng, Y. and B. R. Cullen (2004). "Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5." Nucleic Acids Res **32**(16): 4776-4785.

Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-117.

Zernecke, A., K. Bidzhekov, et al. (2009). "Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection." Sci Signal **2**(100): ra81.

Zhang, Y., D. Liu, et al. (2010). "Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration." Mol Cell **39**(1): 133-144.

Zhou, Q., M. Li, et al. (2012). "Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes." Int J Biol Sci **8**(1): 118-123.



# **ANNEXES**

# MATERIEL ET METHODES

## I APPAREILS

- ◆ Imageur : Molecular Image® ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad
- ◆ Centrifugeuse : Beckman-Coulter, Allegra X-12R
- ◆ Ultracentrifugeuse : Beckman-Coulter, Optimatm L-80-XP, rotor type 50-2Ti
- ◆ Microscope à fluorescence : ZEISS Axiovert 200 munie d'une caméra Axioacam MRm
- ◆ Microscope électronique à transmission : JEM Jeol 1400 (Tokyo, Japan) équipé d'une caméra Orius 600 (Abusamra, Zhong et al.)
- ◆ Spectrophotomètre : Ultrospec 2100 *pro*, Biosciences
- ◆ Spectrophotomètre : NanoDrop, Labtech, France
- ◆ Luminomètre Glomax™ 20/20 luminometer, Promega
- ◆ Thermocycleur pour PCR quantitative : Rotor-Gene6000 Corbett LifeScience, Paris, France
- ◆ Appareil pour RT-PCR : Mini cycler MJ RESEARCH
- ◆ Lecteur de plaques TLDA : Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR system
- ◆ Zetasizer NanoS, Malvern Instruments, UK
- ◆ xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyze) DP Instrument, Roche Applied Science
- ◆ Scepter 2.0 handheld automated cell counter, Millipore
- ◆ Lecteur de plaque pour ELISA : Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation

## II PRODUITS

### ◆ BIOLOGIE CELLULAIRE

- milieux de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) à 4,5g/L ou 1g/L de glucose, PPA laboratories
- milieux de culture Ham-F10, PPA laboratories
- le sérum de veau fœtal (SVF) qualité standard, PPA laboratories
- la trypsine-EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid), PPA laboratories
- l'antibiotique-antimycotique (pénicilline-streptomycine), PPA laboratories
- la L-glutamine (200mM), PPA laboratories
- Ultroser G, Biosepra
- AVP (Arginine 8 vasopressine) : Sigma-Aldrich
- Bovine Serum Albumin (BSA), free fatty acid, Roche Diagnostics
- insuline humaine, Sigma-Aldrich
- palmitate, Sigma-Aldrich
- PBS (Phosphate Buffered Saline), PAA laboratories
- anticorps anti-myogénine F5D; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA.
- anticorps anti-IgG de souris couplés à l'alex-Fluor 555, Molecular Probes/Invitrogen

- DAPI, H1200; Vector Laboratories, Peterborough, England
- réactif de transfection HiPerFect, Qiagen
- réactif de transfection ExGen 500, Euromedex
- vecteur pEZX-MT01 contenant la séquence 3'-UTR complète de Sirt1 : GeneCopoeia, LabOmics, Belgium, clone MmiT032125-MT01.
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega, #E1910
- siRNA ciblant l'ARNm de Itga7 (#SI02733290, Qiagen)
- contrôle négatif siRNA : AllStars Negative Controls # 1027280, Qiagen
- ALPCO immunoassays Insulin (mouse) Elisa, Alpco Diagnostics

#### ◆ BIOLOGIE MOLECULAIRE

- TriPure Isolation Reagent, Roche Applied Science, France
- SuperScript II® RNase H- Reverse Transcriptase, Invitrogen
- ABSolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Abgene, Courtaboeuf, France)
- amorces ITGA7 : Qiagen (Quantitect Primer Assay, QT00136990)
- amorces SIRT1 :
  - S-GATAAGACGTCATCTTCAGAG**
  - AS-TGAGAAAATGCTGGCCTAATA**
- amorces HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) :
  - S-AGTTGAGAGATCATCTCCA**
  - AS-TTGCTGACCTGCTGGATTAC**
- TaqMan®miRNA Assays (LifeTechnologies)
- TaqMan® Low Density Arrays V2 (57)
- TaqMan Universal PCR Master mix (2X)
- 384-well reaction plate

#### ◆ WESTERN-BLOT

- Kit d'immuno-détection ECL Luminata Classico, Millipore
- Kit de dosage Bradford des protéines : Bio-Rad
- Mélange acrylamide-bisacrylamide (solution 30%), Euromedex
- tampon de migration TG-SDS (Tris-Glycine- Sodium Dodecyl Sulfate pH~8,5), Euromedex
- tampon de transfert TG (Tris-Glycine pH~8,5), Euromedex
- standard de migration Precision Plus Proteins™ Standards : Bio-Rad
- membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride) de nitrocellulose 0,2 µm, Bio-Rad
- tampon TBS (Tris Buffered Salin pH~7,5), Euromedex
- Tween® 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate Polysorbate 20), Euromedex
- méthanol pur, Carlo Erba Reagents
- BSA (Fraction V- pH 7,0), Euromedex
- SDS (Sodium Sodécyll Sulfate), Promega
- sodium déoxycholate, Sigma-Aldrich
- Nonidet NP40, Sigma-Aldrich
- EDTA Ethylene Diamine Tetra Acetic acid, Sigma-Aldrich
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sodium orthovanadate), Sigma-Aldrich
- NaF (Fluorure de sodium), Sigma-Aldrich
- DTT (DL-Dithiothreitol), Sigma-Aldrich
- cocktail d'inhibiteurs de protease (1000X), Sigma-Aldrich
- Laemmli : Tris HCL 50mM, Glycérol 12%, SDS 1%, β-mercaptoéthanol 4%, bleu de bromophénol 0,01%, pH 6,8, Sigma

- tampon de lyse RIPA : PBS, SDS 0.1%, sodium déoxycholate 0.5%, Nonidet NP40 1%, EDTA 5mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 20mM, DTT 1mM, cocktail d'inhibiteurs de protéase 1X.

- Anticorps primaires

Protéines	Spécificité Anticorps	Espèce	Taille (Kda)	Référence	Fournisseur
<b>Alix</b>	Polyclonal	chèvre	95	sc-49268	Santa Cruz Biotechnology
<b>B-actine</b>	Polyclonal	lapin	42	A5060	Sigma-Aldrich
<b>Calnexine</b>	Polyclonal	lapin	90	S0998	Epitomics
<b>CD63</b>	Polyclonal	lapin	53	sc-15363	Santa Cruz Biotechnology
<b>CD81</b>	Monoclonal	souris	22-26	sc-166028	Santa Cruz Biotechnology
<b>COL18A1</b>	Monoclonal	souris	20	sc-32720	Santa Cruz Biotechnology
<b>COL6A2</b>	Polyclonal	lapin	109	sc-83607	Santa Cruz Biotechnology
<b>DESMIN</b>	Polyclonal	lapin	53	sc-14026	Santa Cruz Biotechnology
<b>Intégrine <math>\alpha</math>7</b>	Polyclonal	lapin	97	sc-50431	Santa Cruz Biotechnology
<b>Intégrine B1</b>	Monoclonal	lapin	140-150	04-1109	Millipore
<b>Intégrine B5</b>	Polyclonal	rabbit	96	PAB11684	Tebu-Bio
<b>Laminine</b>	Polyclonal	lapin	400	L9393	Sigma-Aldrich
<b>OxPhos total (5 sous unités)</b>	Monoclonal	souris	20, 30, 40, 48 et 55	MS604	MitoSciences
<b>PKB phosphorylée (Ser473)</b>	Monoclonal	lapin	60	#4060	Cell Signaling
<b>Sirt-1</b>	Polyclonal	lapin	120	#2028	Cell Signaling
<b>TGF<math>\beta</math> RII</b>	Polyclonal	lapin	75	sc-220	Santa Cruz Biotechnology
<b>Transgelin-2</b>	Polyclonal	chèvre	22	sc-51441	Santa Cruz Biotechnology
<b>TSG101</b>	Polyclonal	chèvre	45	sc-6037	Santa Cruz Biotechnology
<b>TSPAN8</b>	Polyclonal	lapin	27	SAB2102595	Sigma-Aldrich



# III METHODES

## III.1 Culture cellulaire

### III.1.1 Lignées cellulaires musculaires

#### III.1.1.a Les cellules musculaires de souris C2C12

La lignée musculaire murine C2C12, établie à partir du tissu musculaire prélevé chez des souris adultes C3H (Yaffe 1968; Yaffe and Saxel 1977), est un modèle d'étude de la myogenèse très utilisé car les cellules prolifèrent et demeurent indifférenciés aussi longtemps qu'ils sont maintenus à faible confluence. A confluence, ces cellules peuvent induire le processus de différenciation myogénique et fusionner pour donner des myotubes plurinucléés, qui expriment les différents marqueurs caractéristiques de la différenciation.

Deux types de milieu sont utilisés pour la culture de ces cellules :

- le milieu de prolifération composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), contenant 4.5g/L de glucose, supplémenté de 10% de Sérum de veau foetal décomplémenté (SVF<sub>d</sub>), 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine.
- Le milieu de différenciation composé de DMEM contenant 4.5g/L de glucose, supplémenté de 2% de SVF<sub>d</sub> (ou 2% de sérum de cheval, HS), 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine.

#### III.1.1.b Les cellules musculaires de rat L6

La lignée myogénique L6 (sous-clone C5) est établie à partir de cellules de rats nouveau-nés (Yaffe and Saxel 1977). De la même façon, les cellules de cette lignée ont une forte capacité de différenciation dans des milieux de culture contenant peu de sérum.

Deux types de milieu sont utilisés pour la culture de ces cellules :

- le milieu de prolifération composé de DMEM contenant 4.5g/L de glucose, supplémenté de 10% de SVFd, de L-glutamine et de pénicilline-streptomycine.
- Le milieu de différenciation composé de DMEM contenant 4.5g/L de glucose, supplémenté de 2% de SVFd, de L-glutamine, de pénicilline-streptomycine et d'AVP à  $10^{-7}$  ([Arg<sup>8</sup>-Vasopressine], hormone neurohypophysaire stimulatrice de la différenciation myogénique *in vitro*).

### III.1.2 Modèle *in vivo* de cellules musculaires

Des souris C57Bl/6 sont nourries avec un régime standard supplémenté avec 20% de palmitate (souris HP, High Palmitate). En parallèle, des souris ayant un régime standard sont utilisées comme contrôle (souris SD, Standard Diet). Des prises de sang sont effectuées régulièrement afin de déterminer leur glycémie à jeun et leur sécrétion d'insuline.

Deux groupes de souris sont utilisés :

- Un groupe traité pendant 8 semaines avec du palmitate. Ces souris sont en surpoids, mais ne présentent pas d'insulino-résistance musculaire.
- Un groupe traité pendant 16 semaines avec du palmitate. Ces souris sont obèses et présentent une insulino-résistance musculaires

Après avoir récupéré les muscles (quadriceps ou gastrocnémien) sur les souris, ils sont dilacérés et placés 24h dans des boîtes de Pétri dans du DMEM High Glucose, sans sérum de veau fœtal. Le lendemain la totalité est centrifugée à 2.000g pendant 20 minutes à 4°C et le surnageant est congelé à -80°C (pour une future extraction des exosomes sécrétés) tandis que le culot musculaire est cryogénisé dans l'azote liquide et stocké à -80°C (pour une future extraction protéique).

## III.2 Protocoles expérimentaux basés sur les exosomes

### III.2.1 Elimination des exosomes du sérum des milieux de culture

Afin de récupérer les exosomes sécrétés par un type cellulaire ou afin d'étudier les effets des exosomes isolés à partir de ce dernier, il est nécessaire d'éliminer les exosomes contenus dans le sérum utilisé selon le milieu de culture envisagé. Pour ce faire, le milieu complet envisagé est ultracentrifugé à 100.000g une nuit à 4°C. Le surnageant dépleted en exosomes du sérum est alors filtré à 0,2µm et est stocké à 4°C (milieu MSE).

### III.2.2 Isolement des exosomes des milieux conditionnés

L'extraction des exosomes à partir de milieu conditionné est effectuée selon le protocole décrit par (They, Amigorena et al. 2006). Brièvement, une première centrifugation à 2.000g 4°C pendant 20 minutes permet d'éliminer les cellules mortes, puis celle à 10.000g pendant 30min à 4°C, les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite filtré 0,2µm pour éliminer toutes particules dont la taille est supérieure à 200nm puis le filtrat est ultracentrifugé à 100.000g 4°C pendant 70 minutes au minimum. Le culot est ensuite lavé au PBS froid et stérile pendant 70 minutes minimum à 100.000g 4°C. Enfin le culot est repris dans du PBS froid stérile et congelé à -80°C. Un aliquote de l'échantillon est au préalable récupéré afin d'effectuer un dosage Bradford et d'évaluer la quantité protéique d'exosomes purifiés. Par ailleurs, un volume du filtrat est congelé ; il constituera le milieu conditionné complet (contenant les exosomes sécrétés) tandis que le surnageant issu de la première ultracentrifugation est également congelé et correspond au milieu conditionné dépleted en exosomes.

## III.2.3 Caractérisation des exosomes

### III.2.3.a Caractérisation morphologique

#### III.2.3.a.1 Estimation de la taille des vésicules par granulométrie

La distribution des tailles des nanovésicules extraites a été déterminée par l'utilisation du Zetasizer NanoS90. Son fonctionnement repose sur le principe de diffusion de la lumière par des particules éclairées (théorie de Mie) : on parle alors de granulométrie par diffusion de lumière (Dynamic Light Scattering) aussi connue sous le nom de spectroscopie de corrélation de photons (Photon Correlation Spectroscopy). La granulométrie par diffusion de la lumière permet de mesurer le diamètre de particules, dont la taille est inférieure au micron, en suspension dans un liquide. Cette méthode repose sur la détermination de la vitesse des particules colloïdales lorsqu'elles sont soumises au mouvement brownien. Elle donne ensuite accès au diamètre hydrodynamique des particules, qui prend en compte la couche de solvatation du voisinage de la surface, en utilisant la loi de Stokes-Einstein. Le granulomètre Zetasizer utilisé permet d'analyser des particules de taille comprise entre 1 nm et 3  $\mu\text{m}$ .

Les paramètres utilisés pour la caractérisation de population de taille des différentes nanovésicules purifiées sont les suivants :

<b>Diluant</b>	PBS
<b>Température</b>	Ambiante (20 °C)
<b>Indice de réfraction</b>	1,332
<b>Viscosité du dispersant</b>	1,029 cP

Le logiciel de l'appareil détermine après le passage des différents échantillons, la distribution de taille des particules présentes dont le diamètre moyen correspondant.

### III.2.3.a.2 Microscopie électronique à transmission

Effectué par le CeCILE (Centre Commun d'Imagerie de Lyon-Est, faculté de Médecine Lyon-Est, site Laënnec, Lyon, France), la préparation des échantillons a été effectuée par le département de Microscopie Electronique. Brièvement, les vésicules sont adsorbées sur une grille spécifique, préalablement préparée. Après la saturation des sites aspécifiques avec de la BSA 1%, les grilles sont dans un premier temps incubées avec l'anticorps primaire souhaité (CD63 ou TSG101 dilués au 1/50). S'ensuivent plusieurs lavages, une nouvelle étape de saturation puis la grille est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à des billes d'or (dilution 1/80). Après un lavage de la grille, cette dernière est colorée avec de l'acide phosphotungstique 2% puis la préparation est observée avec un microscope électronique à transmission.

### III.2.3.b Caractérisation du contenu

#### III.2.3.b.1 Composition protéique

La caractérisation du contenu des exosomes purifiés a été effectuée par spectrométrie de masse en tandem (nano-LC-MS/MS), Nano liquid chromatography tandem mass spectrometry). La spectrométrie de masse LC-MSMS est particulièrement bien adaptée pour l'identification de protéines présentes dans un mélange complexe et la mise en évidence de modifications post-traductionnelles. Réalisé par plateforme d'analyses protéomiques de Grenoble (EDyP, Etude de la Dynamique des Protéines), la technique consiste, brièvement, en une première étape de d'isolation sur gel des différentes bandes protéiques présentes dans l'échantillon. Après excision des bandes, digestion des protéines pour obtenir de simples peptides, ces dernières sont analysées par la méthode Nano-LC-MS/MS : le mélange peptidique, injecté au niveau de la LC, est séparé par chromatographie sur une colonne apolaire. Au cours de leur élution, les peptides sont transmis vers la source du spectromètre de masse où ils sont ionisés. Par la suite, l'appareil mesure

la masse des ions. La rapidité des analyseurs permet l'analyse en continu des peptides en sortie de chromatographie. L'acquisition des différentes données permet par la suite la reconstitution de la séquence en acides aminés des différents peptides et de ce fait l'identification de la protéine par l'analyse des banques protéiques.

#### III.2.3.b.2 Composition en microARNs

L'étude du contenu en acide nucléique des exosomes a principalement été basée sur la caractérisation des miRNAs présents au sein de ces nanovésicules. La caractérisation des miRNAs matures présents a été effectuée par l'utilisation des plaques TLDA (TaqMan® Low Density Arrays V2) d'Applied Biosystems, selon le protocole fourni par le fournisseur. 100 nanogrammes d'ARN total extrait (protocole d'extraction des ARN totaux décrit dans le paragraphe 6.1) sont dans une première étape convertie en cDNA par transcription inverse. Ces produits de la reverse transcription sont dilués 62,5 fois dans de l'eau stérile puis mélangé avec le mélange TaqMan Universal PCR Master mix (2X). Après le dépôt de la préparation dans les puits des plaques « 384-well reaction plate », la PCR quantitative est réalisée par le thermocycleur Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR system.

#### III.2.4 Effets des milieux conditionnés et des exosomes isolés sur les cellules musculaires des lignées C2C12 ou L6

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à la concentration de 2500 cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par son équivalent MSE 5% sérum préalablement préparé ou par les milieux conditionnés complets et déplétés en exosomes. Après 3 heures d'incubation, les cellules sont observées au microscope puis les exosomes sont ajoutés dilués dans le milieu MSE adéquat. 24 heures après l'ajout des nanovésicules, les ARN et les protéines sont extraites afin d'étudier l'effet du contenu exosomal sur la prolifération cellulaire. Les cellules sont également incubées dans le milieu MSE de prolifération jusqu'à confluence puis le

milieu est remplacé par le milieu de différenciation correspondant aux cellules en culture pendant 24 heures et 48 heures. A l'issue de ces deux temps après l'initiation de la différenciation myogénique, les ARN et les protéines sont extraits afin d'analyser l'effet de l'exosome sur la différenciation musculaire via l'étude des marqueurs précoces de ce processus cellulaire.

### III.3 Utilisation du palmitate pour induire une insulino-résistance des cellules musculaires

#### III.3.1 Préparation du palmitate

La solution mère de palmitate est préparée à partir de palmitate sous forme de poudre (Sigma) ; ajoutée à du DMEM sans sérum contenant 10% de BSA (free fatty acid, Roche Diagnostics), pour obtenir une concentration à 8 mM. Cette solution est chauffée pendant 2 heures à 55°C, sous agitation, pour complexer le palmitate avec la BSA. Puis la solution est filtrée (0.2 µm) en condition stérile et stockée à -20°C. La même procédure est utilisée pour préparer la BSA à 10% dans du DMEM sans sérum. Cette solution est utilisée comme contrôle.

#### III.3.2 Traitement des C2C12 au palmitate

Pour les incubations en présence de différentes concentrations de palmitate, et à différents temps, les C2C12 différenciées ont été cultivées dans des plaques 6 puits ou des flasques F75 (75 cm<sup>2</sup>). Les cellules C2C12 différenciées ont été cultivées en présence de 200, 500 et 700 µM de palmitate pendant 9, 18 et 24 heures ou 200, 500 et 700 µM de BSA 10% dans du DMEM sans sérum (pour le contrôle). A la fin du traitement et dans le but de vérifier l'efficacité du traitement au palmitate, le milieu est remplacé par du DMEM sans sérum pendant 15 minutes,

contenant 100 nM d'insuline humaine (Sigma) et la phosphorylation de la protéine PKB est vérifiée par Western-blot.

## III.4 Modulation de l'expression génique

### III.4.1 Répression de la transcription par les siRNAs

L'introduction dans la cellule de petites séquences ARN, les siRNAs (small interfering RNA) connues pour s'hybrider de façon complémentaire avec l'ARN messenger, permet d'inhiber l'expression de gènes spécifiques. Cette méthode est ici utilisée pour inhiber l'expression de la protéine intégrine  $\alpha 7$  dans les cellules musculaires murines différenciées de la lignée C2C12 par l'utilisation des siRNAs dirigés contre le mRNA de cette protéine. Des myotubes de la lignée C2C12 sont transfectés pendant 36h avec ce siRNA ou un siRNA contrôle (siRNA random). 1.2 $\mu$ g de siRNA ont été transfectés pour chaque f75 à l'aide du réactif HiPerfect transfection reagent (Quiagen), selon les indications fourni par le fournisseur. Ce transfectant est un mélange de lipides neutres et cationiques qui permet la formation de micelles autour des molécules nucléiques en laissant incuber la solution de siRNA dans du milieu DMEM sans sérum pendant 15 minutes. Puis les complexes formées sont déposées goutte à goutte au dessus des cellules.

A l'issu de la transfection les myotubes sont incubés dans du milieu MSE de différenciation pour récupérer au bout de 48h les exosomes sécrétés par ces dernières. En parallèle, une f75 permet d'extraire les protéines du lysat cellulaire et de vérifier de ce fait la perte de l'expression de la protéine étudiée.

### III.4.2 Surexpression protéique par les adénovirus

Les adénovirus sont des virus non enveloppé à ADN double brin linéaire. L'incorporation dans leur génome d'une séquence d'intérêt permet après infection



d'une culture cellulaire, la surexpression de la protéine correspondante avec une forte efficacité, même dans les cellules ne proliférant plus (myotubes) Dans l'unité CaRMen, de nombreux adénovirus recombinants ont été conçus et permettent ainsi de surexprimer des protéines mais aussi des miRNAs. Les adénovirus ont été utilisés à une concentration infectieuse de  $10^8$  pfu/mL (Ad-MyoD1, Ad-GFP (contrôle), Ad-miR-133a, Ad-miR-1....) pour une durée de 18h. L'efficacité de l'infection est vérifiée par western-blot ou par RT-qPCR.

## III.5 Etude de la régulation transcriptionnelle par les miARNs

### III.5.1 Transfection avec le vecteur contenant la région 3'UTR du gène de la Sirtuin-1

Afin d'étudier l'interaction de miR-133a sur la région 3'UTR du gène Sirtuin-1, nous avons utilisé une construction plasmidique contenant cette partie 3'-UTR, couplée au gène rapporteur codant pour la luciférase Firefly et Rénilla. La luciférase est le rapporteur génétique le plus utilisé, parce qu'hautelement sensible à la détection, absent naturellement dans les cellules et par son faible coût pour une reproductibilité expérimentale efficace. Les luciférases Firefly et Rénilla sont très souvent utilisés comme co-rapporteurs parce que ce sont des enzymes dont la structure et le substrat sont distincts.

- La luciférase « Firefly » (*Photinus pyralis*) est un reporter idéal pour contrôler à la fois l'activité du promoteur et les régulations post-transcriptionnelles au cours de la modulation de l'expression génique. Enzyme cytoplasmique d'un poids moléculaire de 61 kDa, elle catalyse la réaction suivante en présence de  $Mg^{++}$  :



L'intensité de l'émission de la lumière produite est linéairement corrélée à la quantité de luciférase et est détectable par un luminomètre.

- La luciférase Rénilla (*Renilla reniformis*) est une protéine monomérique de 36 kDa qui catalyse la réaction enzymatique suivante :



Le vecteur pEZX-MT01 possède les gènes rapporteurs Firefly luciferase sous le contrôle du promoteur SV40 et Rénilla luciferase sous le contrôle d'un promoteur CMV. En aval du gène rapporteur Firefly Luciferase est cloné la séquence 3'-UTR du gène étudié, et par conséquent l'expression de la luciferase est régulée par la fixation de miRNAs si ces derniers sont complémentaires de la séquence 3'UTR. À l'inverse, l'expression de la luciférase Rénilla est constitutive et sa mesure est utilisée comme un contrôle de la transfection et pour normaliser la quantité de Firefly luciferase détecté. Le kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System de Proméga permet de mesurer successivement les activités de ces deux luciférases.

Du point de vue expérimental, les myoblastes de la lignée C2C12 sont ensemencés dans des plaques 6 puits. Dès que les cellules occupent environ 60% du puits, le vecteur pEZX-MT01 qui contient la séquence 3'-UTR complète du gène Sirt1 (Sirtuin, silent mating type information regulation 2 homolog) est introduit dans les cellules : transfection de 1 µg de vecteur à l'aide du transfectant ExGen 500, selon les recommandations du fournisseur. 24h après, les cellules sont incubées en présence ou non des exosomes de myoblastes ou de myotubes de C2C12. À confluence, les cellules sont mises à différencier pendant 48 heures.

Dans le cas où les cellules sont incubées en présence d'un adénovirus et non avec les exosomes, le protocole utilisé est différent. L'infection des cellules est réalisée avant la transfection afin que la surexpression ait le temps de se réaliser. De ce fait, dès que les myoblastes de la lignée C2C12 ont atteints 50% de confluence environ, les cellules sont infectées par  $10^8$  particules adénovirales recombinantes exprimant la GFP (contrôle), le pré-miR-1-1 (témoin négatif) ou le pré-miR-133a-1 d'intérêt pendant 18h. Puis de la même façon que précédemment, 1 µg du vecteur est transfecté par ExGen500 dans les cellules.

## III.5.2 Dosage de la luciférase

Le dosage de la luciférase est basé sur la mesure séquentielle de l'activité de firefly (*Photinus pyralis*) qui correspond à l'expression de la séquence codante cette activité, située en aval du segment 3'-UTR du gène étudié et de l'activité Renilla (*Renilla reniformis*) qui correspond à l'expression du vecteur transfecté et sert de ce fait de paramètre comparatif de l'efficacité de transfection des cellules. La mesure de ces deux activités de luciférase est réalisée par l'utilisation du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System selon le protocole fourni par Proméga. L'activité luciférase Firefly est normalisée par rapport à celle de la luciférase Renilla.

## III.6 Mesure de l'expression génique

### III.6.1 Préparation des ARN

Les extractions des ARN totaux à partir des cellules en culture ont été réalisées à l'aide de TRIzol® reagent (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Les ARN extraits sont ensuite dosés par spectrophotométrie à 260nm (Nanodrop).

### III.6.2 Reverse transcription et dosages des mRNAs cibles

La RT est réalisée sur 1µg d'ARN totaux, de manière non spécifique, en présence de 100U SuperScript II® RNase H- Reverse Transcriptase, d'un mélange d'oligodT et d'hexamères oligonucléotidiques non spécifiques.

Les ARNm sont ensuite quantifiés par PCR quantitative en temps réel. Cette dernière est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent à chaque cycle d'amplification. L'observation de la quantité de fluorescence émise à chaque cycle permet de déterminer la cinétique d'amplification de la PCR afin de

déterminer la zone d'amplification exponentielle pendant laquelle l'augmentation du signal est proportionnelle à la quantité d'ADNc présente au début de la réaction. Les ARN messagers sont quantifiés en utilisant des amorces spécifiques des ADNc étudiés. La PCR quantitative est réalisée sur 5µL du produit de RT dilué au 1/60<sup>ème</sup>, mélangé à 15µL de milieu réactionnel Absolute<sup>TM</sup> QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Mix, à l'aide d'un Rotor-Gene 6000<sup>TM</sup> (Corbett Research, Mortlake, Australia).

### III.6.3 Reverse transcription et dosages des miRNAs

La RT est réalisée sur 1ng d'ARN totaux, en présence de 50U de multiscribeRTase, d'un mélange d'oligodT et d'amorces RT spécifiques du microARN à quantifier. La quantification est ensuite réalisée par PCR quantitative en temps réel, à l'aide d'un Rotor-Gene 6000<sup>TM</sup> (Corbett Research, Mortlake, Australia), à partir de 3µL du produit de RT dilué au 1/60<sup>ème</sup>, mélangé à 17µL de milieu réactionnel TaqManPCR Master Mix et d'amorces PCR spécifiques du microARN à quantifier.

## III.7 Mesure de l'expression et quantification protéique par Western-Blot

### III.7.1 Extraction des protéines

Les cellules sont lysées et récoltées par grattage dans du tampon de lyse RIPA (composition détaillée dans la partie II, section western blot), incubées sur glace 20 minutes et centrifugées 15 min à 13.000g 4°C. On conserve le surnageant et un aliquot est prélevé pour la quantification des protéines à l'aide du réactif de Bradford. La lecture se fait au spectrophotomètre à 595nm (Ultrospec 2100 *pro*, Amersham Biosciences).

### III.7.2 Western-Blot

Les lysats cellulaires sont dénaturés à 100°C pendant 10 minutes en présence de Laemmli Buffer 1X puis séparés en condition dénaturante par SDS-PAGE selon leur masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide à 80V dans un premier temps, puis à 100V pendant 1h30 environ. La migration est contrôlée grâce au front de bleu de bomophénol et au marqueur de taille précoloré déposé permettant en outre de déterminer les masses moléculaires des protéines étudiées.

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF 0,2µm (fluorure de polyvinylidène) à 100V pendant 1 heure environ. A l'issue du transfert, la membrane est saturée dans une solution de TBS/0,3%Tween/4%BSA. La membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt puis avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase et enfin mise en présence d'un substrat de la peroxydase. Les protéines sont détectées par chimioluminescence catalysée par la peroxydase en présence de luminol et d'eau oxygénée. Les protéines sont visualisées grâce à un imageur (Molecular Image® ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad) et quantifiées grâce au logiciel Image Lab 3.0 (Bio-Rad).

### III.8 immunofluorescence

Les cellules sont lavées au PBS puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS puis perméabilisées avec une solution de Triton 0,1% dans du PBS durant 10 minutes à 4°C. Après un nouveau cycle de lavages, les cellules sont mises en présence d'une solution de saturation BSA 0,1% pendant 20 minutes à température ambiante pour bloquer le marquage aspécifique. Ensuite, les cellules sont incubées 1 heure avec l'anticorps primaire anti-myogénine (F5D, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City IA) dilué au 1/50<sup>ème</sup> à température ambiante. Après un lavage au PBS-BSA 1%, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'AlexaFluor 555 dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans une solution de PBS-0,1% BSA. Les noyaux sont révélés par un marquage au DAPI (4,5-diamidino-2-phenylindole) 1µg/mL pendant 3 minutes à température ambiante. Les

cellules immunomarquées sont photographiées à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra.

### III.9 Mesure de la prolifération cellulaire

L'utilisation de l'appareil xCELLigence RTCA DP de Roche permet de mesurer l'impédance et ainsi de suivre l'évolution de la prolifération de cellules en temps réel. En effet, les plaques utilisées (E-plates) sont des plaques 96 puits dont le fond est recouvert de micro-électrodes. Les impulsions électriques générées régulièrement permettent de déterminer l'impédance générée par la présence des cellules ensemencées. Cette dernière évolue au cours de la prolifération cellulaire, que cela soit lié au grossissement de la cellule, préalable à la mitose puis essentiellement à la multiplication des cellules en prolifération.

Le protocole établi et réalisé pour l'étude de l'effet des exosomes sur la prolifération des cellules est le suivant : un calibrage de la plaque est en premier lieu effectué en présence du milieu de culture, puis les cellules sont ensemencées à la concentration de 2.500 cellules/cm<sup>2</sup>, en laissant au minimum deux puits sans cellule (témoin). Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par son équivalent MSE, ou par les différents milieux conditionnés selon le protocole établi. De la même façon que pour les plaques 6 puits, les exosomes sont ajoutés 3h après le changement de milieu. La mesure de l'impédance est alors réalisée toutes les 30 minutes pendant une période de temps variable selon le protocole établi. Les données enregistrées par l'appareil permettent par la suite de donner de nombreuses informations concernant l'état biologique des cellules : le nombre de cellules, la viabilité et la morphologie. Ces données peuvent être complétées en fin d'expérience par le comptage des cellules et la détermination de leur taille par le « Scepter 2.0 handheld automated cell counter ».

# PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

## I Articles scientifiques

**Forterre, A.**, Jalabert, A., Berger, E., Baudet, M., Chikh, K., Errazuriz, E., De Larichaudy, J., Record, M., Geloën, A., Lefai, E., Tchernof, A., Vidal, H., Couté, Y., and Rome, S. (2012). C2C12 myoblast and myotube secrete specific exosome-like vesicles involved in myogenesis. *Molecular and Cellular Proteomics* (en révision).

**Forterre, A.**, Jalabert, A., Chikh, K., Pesenti, S., Euthine, V., Granjon, A., Errazuriz, E., Lefai, E., Vidal, H., and Rome, S. (2012). Myotubes sorted specific exosomal miRNAs which regulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell communication and signaling* (soumis).

## II Communications orales scientifiques

### **Octobre 2011 > Rencontre du club français du muscle à Lyon**

C2C12 myoblast and myotube secrete specific populations of exosome-like vesicles involved in differentiation. Forterre, A., Jalabert, A., Chikh, K., Errazuriz, E., Baudet, M., Couté, Y., Vors, C., Record, M., Nemoz, G., Vidal, H., Lefai, E., and Rome, S.

### **Mars 2012 > 20ème reunion de l'association G2L2 (Genève, Grenoble, Lyon, Lausanne) à Lyon**

C2C12 myoblast and myotube secrete specific exosome-like vesicles involved in myogenesis. Forterre, A., Jalabert, A., Berger, E., Baudet, M., Chikh, K., Errazuriz, E., De Larichaudy, J., Vors, C., Michalski, M.C., Record, M., Geloën, A., Lefai, E., Tchernof, A., Vidal, H., Couté, Y., and Rome, S.

### **Septembre 2012 > Journée séminaire entre les unites Inserm U1060 et U1055 à Grenoble**

Caractérisation des exosomes sécrétés par le muscle squelettique (rôles dans la myogenèse et dans l'insulino-résistance musculaire). Forterre A.

### **Novembre 2012 > 10ème journées annuelles de la Société Française de Myologie à Grenoble**

Myotubes sorted specific exosomal miRNAs which regulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. Alexis Forterre, Audrey Jalabert, Karim Chikh, Sandra Pesenti, Vanessa Euthine, Aurélie Granjon, Elizabeth Errazuriz, Etienne Lefai, Hubert Vidal and Sophie Rome.

### **III Posters scientifiques**

#### **Mars 2012 > 20ème reunion de l'association G2L2 (Genève, Grenoble, Lyon, Lausanne) à Lyon**

C2C12 myoblast and myotube secrete specific exosome-like vesicles involved in myogenesis. Forterre, A., Jalabert, A., Berger, E., Baudet, M., Chikh, K., Errazuriz, E., De Larichaudy, J., Vors, C., Michalski, M.C., Record, M., Geloën, A., Lefai, E., Tchernof, A., Vidal, H., Couté, Y., and Rome, S.

#### **Mars 2012 > Congress of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) à Gothenburg en Suède**

C2C12 myoblast and myotube secrete specific exosome-like vesicles involved in myogenesis. Forterre, A., Jalabert, A., Berger, E., Baudet, M., Chikh, K., Errazuriz, E., De Larichaudy, J., Vors, C., Michalski, M.C., Record, M., Geloën, A., Lefai, E., Tchernof, A., Vidal, H., Couté, Y., and Rome, S.



---

## **Rôle des exosomes sécrétés par le muscle strié squelettique au cours de la myogenèse et en situation d'insulino-résistance**

---

### **RESUME**

Les exosomes sont des nanovésicules de 30 à 100nm sécrétées dans le milieu extracellulaire par une grande majorité de types cellulaires. Entourés d'une bicouche lipidique similaire aux radeaux lipidiques, ils contiennent des protéines, de l'ARNm et des microARNs. Récemment, il a été montré que les exosomes pourraient participer aux dialogues moléculaires inter-organes, au même titre que les protéines solubles (hormones et cytokines).

Au cours de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que le muscle squelettique pourrait utiliser les exosomes comme mode de communication intercellulaire, en plus des myokines qu'il sécrète. Nous avons montré en couplant des techniques de microscopie électronique, de génomique, de biologie cellulaire et moléculaire, et d'analyses protéomiques, que le muscle était capable de sécréter des exosomes, dont la composition variait au cours de la myogenèse. De plus, nous avons montré que les exosomes sécrétés par les cellules prolifératrices et différenciées avaient des rôles distincts au cours de la différenciation myogénique, via le transfert des microARNs notamment.

En parallèle, nous nous sommes intéressés aux exosomes sécrétés par le muscle squelettique en situation d'insulino-résistance induite par du palmitate. En utilisant une double approche *in vitro* et *in vivo*, nous avons montrés que les exosomes sécrétés par la cellule musculaire insulino-résistante ont une morphologie et une composition luminale modifiée. Enfin, ces exosomes sécrétés sembleraient transmettre un signal délétère à d'autres cellules musculaires différenciées, et aux autres tissus insulino-sensibles, comme le pancréas.

### **MOTS-CLEFS**

exosome, muscle squelettique, microARNs, insulino-résistance, palmitate

---

## **Role of exosomes secreted by skeletal muscle during myogenesis and in situation of insulin resistance**

---

### **ABSTRACT**

Exosomes are nanovesicles from 30 to 100nm, secreted into the extracellular space by a large majority of cell types. Surrounded by a lipid bilayer similar to lipid rafts, they contain proteins, mRNA and microRNAs. Recently, it has been shown that exosomes may be involved in inter-organs dialogues, as well as soluble proteins (hormones and cytokines).

In this thesis, we hypothesized that skeletal muscle could use exosomes as intercellular communication mode, in addition to myokines. We have shown by coupling electron microscopy techniques, genomics, molecular and cellular biology, and proteomic analyzes, that the muscle was able to secrete exosomes, whose composition varied during myogenesis. In addition, we have shown that exosomes secreted by proliferating and differentiated cells have distinct roles during the myogenic differentiation, especially through the transfer of microRNAs.

In parallel, we are interested in exosomes secreted by insulin resistant skeletal muscle, induced by palmitate. Using a dual approach *in vitro* and *in vivo*, we have shown that exosomes secreted by insulin-resistant muscle cells have a morphology and a luminal composition modified. Finally, these exosomes secreted seem to transmit a deleterious signal to other differentiated muscle cells, and other insulin-sensitive tissues such as the pancreas.

### **KEY WORDS**

Exosome, skeletal muscle, microRNAs, insulin-resistance, palmitate

---

## **Rôle des exosomes sécrétés par le muscle strié squelettique au cours de la myogenèse et en situation d'insulino-résistance**

---

### **RESUME**

Les exosomes sont des nanovésicules de 30 à 100nm sécrétées dans le milieu extracellulaire par une grande majorité de types cellulaires. Entourés d'une bicouche lipidique similaire aux radeaux lipidiques, ils contiennent des protéines, de l'ARNm et des microARNs. Récemment, il a été montré que les exosomes pourraient participer aux dialogues moléculaires inter-organes, au même titre que les protéines solubles (hormones et cytokines).

Au cours de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que le muscle squelettique pourrait utiliser les exosomes comme mode de communication intercellulaire, en plus des myokines qu'il sécrète. Nous avons montré en couplant des techniques de microscopie électronique, de génomique, de biologie cellulaire et moléculaire, et d'analyses protéomiques, que le muscle était capable de sécréter des exosomes, dont la composition variait au cours de la myogenèse. De plus, nous avons montré que les exosomes sécrétés par les cellules prolifératrices et différenciées avaient des rôles distincts au cours de la différenciation myogénique, via le transfert des microARNs notamment.

En parallèle, nous nous sommes intéressés aux exosomes sécrétés par le muscle squelettique en situation d'insulino-résistance induite par du palmitate. En utilisant une double approche *in vitro* et *in vivo*, nous avons montrés que les exosomes sécrétés par la cellule musculaire insulino-résistante ont une morphologie et une composition luminale modifiée. Enfin, ces exosomes sécrétés sembleraient transmettre un signal délétère à d'autres cellules musculaires différenciées, et aux autres tissus insulino-sensibles, comme le pancréas.

### **MOTS-CLEFS**

exosome, muscle squelettique, microARNs, insulino-résistance, palmitate

---

## **Role of exosomes secreted by skeletal muscle during myogenesis and in situation of insulin resistance**

---

### **ABSTRACT**

Exosomes are nanovesicles from 30 to 100nm, secreted into the extracellular space by a large majority of cell types. Surrounded by a lipid bilayer similar to lipid rafts, they contain proteins, mRNA and microRNAs. Recently, it has been shown that exosomes may be involved in inter-organs dialogues, as well as soluble proteins (hormones and cytokines).

In this thesis, we hypothesized that skeletal muscle could use exosomes as intercellular communication mode, in addition to myokines. We have shown by coupling electron microscopy techniques, genomics, molecular and cellular biology, and proteomic analyzes, that the muscle was able to secrete exosomes, whose composition varied during myogenesis. In addition, we have shown that exosomes secreted by proliferating and differentiated cells have distinct roles during the myogenic differentiation, especially through the transfer of microRNAs.

In parallel, we are interested in exosomes secreted by insulin resistant skeletal muscle, induced by palmitate. Using a dual approach *in vitro* and *in vivo*, we have shown that exosomes secreted by insulin-resistant muscle cells have a morphology and a luminal composition modified. Finally, these exosomes secreted seem to transmit a deleterious signal to other differentiated muscle cells, and other insulin-sensitive tissues such as the pancreas.

### **KEY WORDS**

Exosome, skeletal muscle, microRNAs, insulin-resistance, palmitate