



HAL
open science

Rôle des microARNs cellulaires et vésiculaires dans la régulation transcriptomique du système nerveux

Anaïs Soula

► **To cite this version:**

Anaïs Soula. Rôle des microARNs cellulaires et vésiculaires dans la régulation transcriptomique du système nerveux. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0794 . tel-01952195

HAL Id: tel-01952195

<https://theses.hal.science/tel-01952195>

Submitted on 12 Dec 2018

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Anaïs SOULA

**Rôle des microARNs cellulaires et vésiculaires dans la
régulation transcriptomique du système nerveux**

Sous la direction de : Alexandre FAVEREAUX

Soutenue le 1 Décembre 2017

Membres du jury :

Martin TEICHMANN	Professeur	Inserm 1212, Bordeaux	Président
Sophie ROME	Directrice de Recherche	Inserm 1060, Lyon	Rapporteuse
Guillaume VAN NIEL	Directeur de Recherche	Inserm 894, Paris	Rapporteur
Alain TREMBLEAU	Professeur	CNRS 8246, Paris	Examineur
Olivier THOUMINE	Directeur de Recherche	CNRS 5297, Bordeaux	Invité

Rôle des microARNs cellulaires et vésiculaires dans la régulation transcriptomique du système nerveux.

Ce travail consiste à étudier l'expression, le rôle et l'échange des microARNs (miARNs), dans le système nerveux (SN). Les microARNs (miARNs) sont des petits ARNs endogènes non-codants qui exercent une régulation négative sur l'expression des gènes, en s'hybridant sur la région 3' non-codante des ARNm cibles.

Dans un premier, nous avons dévoilé le rôle spécifique du miR-92a, dans le contrôle de l'expression de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA, dans un paradigme de plasticité synaptique homéostatique, dans lequel la plasticité synaptique est inhibée.

Nous avons ensuite montré, par RNA-Seq que les miARNs sont différentiellement exprimés entre les structures du SN. Cette technologie nous a aussi permis de révéler la présence de nouvelles espèces de miARNs. De plus les résultats suggèrent que l'expression des miARNs (connus et nouveaux) participe à la signature transcriptomique singulière de chacune des structures.

Dans un troisième temps, notre travail montre que les miARNs peuvent être échangés entre les cellules du système nerveux via les vésicules extracellulaires (EVs). Le contenu des EVs en miARNs varie en fonction de l'activité neuronale, et ces derniers ont pour cibles prédictives des protéines impliquées dans la régulation de la plasticité neuronale. Nos résultats suggèrent donc que l'échange de miARNs via les EVs est un nouveau mécanisme de modulation de la plasticité neuronale.

Enfin, nous proposons un nouvel outil de purification des EVs, qui à l'avenir permettrait de purifier les EVs du SNC selon leur origine cellulaire.

Pour conclure, ce travail apporte une meilleure compréhension du rôle des miARNs dans la régulation de la physiologie du SNC.

Mots clés : microARN ; vésicules extracellulaires ; neurosciences ; RNA-Seq ; miRnome, plasticité neuronale.

Role of cellular and vesicular microRNAs in the transcriptomic regulation of the nervous system.

This work consists in studying the expression, the role and the transport of microRNAs (miRNAs) in the central nervous system (CNS). microRNAs (miRNAs) are small endogenous non coding RNAs, exerting a negative regulation on gene expression. They inhibit protein translation by hybridization on the 3' untranslated region of mRNA.

First, we have revealed the specific role of miR-92a in the control of the expression of GluA1, in an homeostatic plasticity paradigm in which the synaptic plasticity is inhibited.

Second, by using RNA-Seq technology, we showed that miRNAs are differentially expressed in the different structures of the CNS. Moreover, we have discovered new species of miRNAs. Finally, our results suggest that the miRNA expression (of known and new miRNAs) participate in the singular transcriptomic signature of each structure.

Third, we have shown that miRNAs are transported into EVs, and can be exchanged between the cells of the CNS. The miRNA content of EVs varies depending on neuronal activity. Target prediction of these miRNAs includes genes involved in the regulation of neuronal plasticity. Together, our results suggest that the exchange of miRNAs through EVs is a new mechanism involved in the modulation of neuronal plasticity.

Finally, we propose a new tool for purifying EVs depending on their cellular origin.

To conclude, this study allows a better understanding of the role of miRNAs in the regulation of the physiology of the CNS.

Keywords : microRNA ; extracellular vesicles ; neuroscience ; RNA-Seq ; miRnome ; neuronal plasticity

Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences

Université de Bordeaux

CNRS UMR 5297

Equipe : Mécanismes centraux de la sensibilisation à la douleur

Bâtiment Broca Nouvelle-Aquitaine

38 rue Albert Marquet

33000 Bordeaux

Remerciements

Je tiens à commencer par remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse : Madame Sophie Rome, Monsieur Guillaume Van Niel, Monsieur Alain Trembleau, Monsieur Olivier Thoumine, et Monsieur Martin Teichmann.

Je remercie également les membres de mon comité de mi-thèse, qui ont accepté d'évaluer mon travail en cours, et de me conseiller sur mon projet: Monsieur Stéphane Oliet, Madame Clotilde Théry, et Monsieur Martin Teichmann. En particulier, je remercie sincèrement Madame Clotilde Théry de s'être déplacée de Paris, pour nous apporter son expertise sur les vésicules extracellulaires. Les commentaires ont été déterminants dans les stratégies de poursuite du projet.

Pour continuer suivant une logique formelle, j'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble de l'équipe de Marc Landry, auprès de qui j'ai réalisé mes 5 dernières années de formation scientifique : Marc Landry, André Calas, Yves Le Feuvre, Pascal Fossat, Alexandre Favereaux, Christel Baudet, et Rabia Benazzouz. Grâce à votre esprit d'équipe, et au temps que vous prenez à former les étudiants, j'ai eu l'occasion de réussir le concours de l'école doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Bordeaux, et de réaliser ma thèse sous votre œil critique et bienveillant. Un grand merci à vous tous.

La vie d'un laboratoire est éphémère, et une partie de son personnel aussi. Mon expérience de thésarde n'aurait pas été celle que j'ai (bien) vécue sans nos super post-doctorants, Olivier, Maria et Amira, notre adorable mais tempétueux technicien, Sébastien (communément appelé Benquichoux), et mes compairs doctorants Houda, Franck, Otmane, Joao et Charline. J'adresse aussi un grand merci à tous les stagiaires qui ont croisé ma route, et qui chacun à sa façon a égayé notre quotidien : Mélissa, Yazid, Constantin, Nino, Paul-Arnaud, Loïc, Vivien, Camille, Laura, Anthony, Paul, Léo, Gabriella, Rheda, Myriam, Mariam et tous les autres bien sûr.

Nos conversations du midi resteront mémorables, en particulier car elles étaient souvent peu adaptées au contexte de détente légère. Les images et vidéos qui illustraient nos propos en valaient la peine, même si quelques-unes resteront gravées malgré moi. Notre dynamique décalée et absurde sont les composantes de l'identité actuelle de l'équipe

Landry, et je dois bien avouer que quelque part j'en suis fière !

Charline, mes remerciements pour toi ne seront jamais à la hauteur de l'importance que je porte à ta présence pendant ces 5 dernières années. Nous nous sommes rencontrées malgré nous, ici même, au laboratoire, à l'occasion de la réalisation de notre stage de M2. Avec nos deux acolytes Aliénor et Alice, nous formions la brochette de M2, entassée à 4 sur un emplacement réel de 2 personnes. Nous avons aussi résisté aux agressions régulières des dragons femelles de l'autre équipe. Surtout, nous nous sommes soutenues lors de la dure épreuve de préparation du concours de l'école doctorale de Bordeaux. Même si nous savions que la probabilité que nous réussissions toutes les deux était faible, nous nous sommes entraïdées, en partageant tisanes relaxantes (promis ce n'était pas exprès), coca frais et génoises à la framboise. L'épisode de ton encadrant désespéré, à la recherche de la technique sexy sur le balcon, restera pour nous mémorable, et la crise de rire-larmes inoubliable ! Finalement, la solidarité a payé, et nous voilà toutes les 2, 4 ans après, à soutenir notre thèse. Notre vie commune au laboratoire a été, je pense, un peu unique. Je fais particulièrement référence aux moments de décompression : bizutage de bureaux, séance cinéma pour des vidéos peu recommandables, culture générale sur des sujets extrêmes, parties de tennis dans le bureau avec des oranges ou des boulettes à papier, séance de DJ sur un ordinateur qui parle, conception et tournages vidéo, ateliers bricolage... Il y a aussi la fameuse histoire, qui fait notre réputation, de l'enfermement dans les toilettes, et du démontage de porte forcé à la perceuse... Je te remercie également sincèrement pour ton soutien sans faille de tous les jours, grâce à ton optimisme, ta persévérance, ton enthousiasme et ta constance. Ton sens de l'humour est aussi un régal pour détendre l'atmosphère au quotidien. Ta capacité à vouloir relever tous les défis, et surtout à t'impliquer entièrement pour les réussir, t'a menée dans des situations inédites et extraordinaires. Tu as eu l'occasion de proposer à Nagui de lui mettre la tête dans le four lors de ta participation à l'émission « Tout le Monde veut prendre sa place ». Enfin, ta détermination à vouloir participer au prochain Rallye Aïcha des Gazelles t'a entraînée jusque dans les tréfonds du casting de « N'oubliez pas les paroles »... Croisons les doigts, les dunes de sables du désert marocain seront peut-être bientôt devant nos yeux, et ce sera grâce à ton audace ! Charline, merci pour tout.

Olivier, tu mérites également une petite dédicace personnalisée, car ta présence est tout aussi importante. Je te suis extrêmement reconnaissante pour nos conversions « d'avenir », tes conseils avisés m'ont été très utiles dans mes réflexions. Un grand merci

aussi pour la réalisation de tous nos délires, pour nos discussions photo, et pour ton aide sur le logiciel Illustrator. Je retiendrai également nos discussions philosophiques au détour d'une paillasse, toi un café fumant à la main! Olivier, merci pour tout, et je te souhaite une très bonne continuation dans tes projets!

Maria, ou micro chef, membre de l'équipe non revendiquée des minis Favereaux, alias les biologistes moléculaires de l'équipe Landry. Merci d'avoir partagé mon quotidien de « pipetage d'eau dans de l'eau révélant comme par magie l'expression de gènes ». Merci aussi d'avoir été une post-doc aussi cool qu'Olivier, et d'avoir accepté de partager ton bureau avec celui des thésards. Cela nous a permis de réaliser beaucoup de bêtises très sympas. Je te souhaite une bonne continuation en Espagne, je suis certaine que tu vas trouver un nouveau post-doc facilement!

Sébastien, ou Benquichoux, un grand merci à toi aussi! Merci pour ton soutien expérimental, surtout pour le clonage. Merci pour les longues discussions que nous avons eues, sur nos avenir respectifs. J'ai très sincèrement apprécié passer mon temps au labo avec toi, pour ton sens de l'humour, ton caractère de faux calme vraiment amusante, tes expressions et ton accent de croque-maïs, ou encore ta passion excentrique pour la chasse. Un grand merci aussi d'avoir accepté de réaliser mon caprice: faire Bordeaux- Lacanau-Bordeaux à vélo sur une journée, le jour de la finale de la coupe d'Europe de football (France-Portugal). Cette journée ne s'est pas terminée sans séquelles (fessiers irrités et jambes lourdes), mais nous pouvons tout de même être fiers de notre petit exploit d'avoir fait 130 kilomètres dans la journée, avec des vélos pas adaptés! Je vais également te remercier pour ta personnalité un peu mystérieuse et réservée, et t'avouer que ça nous permis d'élaborer de longues théories à ton sujet avec Charline. Avec le recul c'était amusant, car ça ressemblait à un jeu d'enquête :) ! Nous avons aussi passé des moments mémorables aux férias de Bayonne et Dax, et l'épisode de la perte de tes clés de voiture restera inoubliable (la vidéo qui va avec aussi ;)) ! Benquichoux, merci pour tout.

Alexandre, si tu pensais pouvoir y échapper, c'est raté. Bien évidemment, je te remercie de m'avoir acceptée comme stagiaire de master 2, car l'histoire de notre binôme commence ici. Tu as fait un pari en choisissant ma candidature, peu pertinente pour travailler sur du système nerveux, vu mon parcours de biologie cellulaire et physiopathologie. Un grand merci pour m'avoir accordée ta confiance, et pour avoir cru à mon potentiel d'adaptation dans ce nouvel univers. Je te remercie aussi pour ton coaching

dynamique pendant la préparation du concours de l'école doctorale, qui m'a été nécessaire pour le réussir. S'ensuivent ensuite 4 (longues et courtes à la fois) années de thèse ensemble. Comme on peut le dire, notre binôme de travail a été « une affaire qui roule » dans le laboratoire. Mon côté psychorigide du suivi des règles et des protocoles a contrecarré ta petite manie à vouloir toujours adapter une étape. D'un autre côté, ton optimiste débordant m'a rattrapée plus d'une fois d'une chute vertigineuse et sans fond vers le désespoir et la démotivation (incontournable dans le monde de la recherche !). Par contre, nos deux organisations personnelles de rangement des échantillons, sans méthode, nous ont valu de longues recherches, à plusieurs reprises, dans l'ensemble des frigos, congélateurs, et -80°C... Comme quoi, nous n'apprenons pas vraiment de nos erreurs ! Je te remercie aussi sincèrement de m'avoir donné l'occasion, unique je pense, de participer à autant de congrès. J'ai beaucoup aimé voyager-travailler avec toi, même si je retiendrai tes multiples atteintes à ma vie. Je fais par exemple référence à la course à jeun dans Central Park, ou encore à la randonnée et la ballade à vélo dans les montagnes du Colorado ;) . Je te rappelle aussi que tu as failli m'arracher un doigt en repliant un canapé-lit. J'en garde une stigmite terrible: une boule dans la main (j'y tiens, je pense que c'est un morceau d'os ;)). Merci aussi à toutes nos pauses goûter, très souvent accompagnées d'un coca frais et d'une friandise, qui étaient plus dûes à un rituel qu'à un réel besoin. Quand vraiment ça n'allait pas, nous allions tout de même jusqu'à nous acheter la gaufre au chocolat, c'est pour dire. Un grand merci aussi de m'avoir remotivée à courir, et de m'avoir accompagnée à des entraînements. Tu mérites encore un grand merci pour ta compréhension et ton ouverture d'esprit qui m'ont permis de réaliser une formation complémentaire en parallèle de ma dernière année de thèse. Tu as été conciliant et patient en acceptant mon absence régulièrement les vendredis pour me permettre d'aller en cours à Paris, en acceptant mes « vacances-révisions » pour préparer mes partiels, et aussi parfois en prenant le relai expérimental. Je te remercie sincèrement pour tout de m'avoir encouragée et soutenue. Alex, d'une manière générale, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi, et c'est certain que ton encadrement va me manquer.

Je vais aussi remercier l'équipe Thoumine, pour m'avoir fait confiance et proposée un travail en collaboration. Plus particulièrement, un grand merci à Béatrice, Sandra, Olivier et Mathieu. Les projets auxquels j'ai participé m'ont beaucoup plu, et m'ont aidée à m'accrocher dans les moments difficiles de la thèse. Sandra, je suis sincèrement très contente d'avoir travaillé avec toi, d'avoir discuté travail/ vie personnelle, et je te souhaite de bien réussir pour la suite!

Je remercie l'ensemble des ingénieurs et techniciens qui rendent la vie quotidienne au laboratoire plus facile. En particulier, merci à Delphine, Pauline (ou Paulinette), Séverine, Julie(s), Natacha, Zeynep, Célia, mais aussi tous ceux que j'oublie certainement, de m'avoir aidée et conseillée à plusieurs reprises.

Je tiens à remercier Rémi et Jessica, pour leur travail de titan, dans l'ombre et sans relâche. Ce travail est tellement conséquent que ça mérite une organisation pour vous remplacer pendant vos vacances, et que l'ensemble du personnel de l'institut est obligé de mettre la main à la pâte. Rémi, je te dis un grand merci pour ton aide au quotidien. Je tiens également à remercier Emeline, pour ta bonne humeur sans faille, ton professionnalisme, nos longues discussions en salle de culture, pendant les coatings (mais pas que !) et ton sens du dévouement pour la collectivité.

J'en profite pour remercier le personnel administratif en or dont bénéficie l'institut, et en particulier Cédric, Mélanie, Marie-France et Marie-Noëlle. Votre disponibilité, votre efficacité et votre bonne humeur transforment les corvées administratives du quotidien en jeu d'enfant! Un grand merci à vous trois.

Je vais écrire un petit mot à l'équipe avec laquelle j'ai réalisé les terribles entraînements de crossfit depuis peu: Audrey, Julie, Noëlle, Anne, Corey, Thomas, Aurélien, Rémi, et bien sûr JB! Je dois avouer que ce n'était pas facile, et que mes genoux ont bleuit presque à chaque séance, mais que j'ai passé d'excellents moments. Ces séances m'ont permis de décoller de mon écran pendant la période d'écriture, et je suis certaine que ça m'a été très bénéfique. Un grand merci à tous pour l'esprit d'entraide et de dépassement de soi qui règne à chaque fois!

Je remercie également tous mes collègues de thèse de l'institut, avec qui j'ai partagé les grandes étapes, comme la présentation devant l'institut, les demandes de financement, l'écriture et la soutenance de thèse, mais aussi les fameuses bières au Petit Québec (qui ont plus ou moins bien terminées) : Benjamin, Laetitia, Matthieu, Corey, Charline, Thomas, et Tiago.

Je remercie les membres de l'association 2D2B avec qui j'ai réalisé de beaux projets, et passé de super moments. La préparation de la journée de l'école doctorale est

tous les ans une épreuve à passer, mais nous l'avons toujours réussie, et ceci dans la bonne humeur, et la plus ou moins bonne organisation ;).

Bien évidemment, je remercie ma famille, et surtout mes parents et mes grands-parents qui m'ont soutenue tout au long de mes études et de ma thèse, que ce soit financièrement, moralement, ou à base de bons oeufs frais et de tomates du jardin. Merci aussi à mes amis, d'avoir fait l'effort de comprendre mon parcours, et pour tous les excellents moments que nous avons vécus: Amaya, Mathilde, Sarah, Elyse, Manon, Anthony, Chloé. Je vais rebondir sur Chloé, et t'adresser un grand merci pour le temps que tu as passé à relire ma thèse, et à me proposer des corrections, alors que tu devais te reposer pour accueillir ton bébé! Je remercie aussi Alice et Inès, car nous avons passé de super moments ensemble pendant nos thèses respectives en Allemagne-Angleterre-France, chez l'une ou l'autre. Nous avons surtout passé de magnifiques vacances ensemble, par exemple pour nos 25 ans en Islande, et j'en garde un souvenir parfait! Nous nombreuses conversations Watsapp ont parfois été salutaires pour remonter le moral des troupes. Dans tous les cas, nous n'avons jamais perdu le contact, et rien que ça c'est génial! Merci beaucoup à vous deux.

Thomas, un très grand merci à toi, pour ton soutien de tous les jours, ta bonne humeur contagieuse, et ton optimisme sans faille. Je suis certaine que toute ces qualités sont le succès de notre réussite à rédiger nos thèses respectives, assis à 1m l'un de l'autre, sous les 37 °C de l'été bordelais, sans nous être étripés. Je te redis un grand merci pour ton soutien et tes encouragements lors de la réalisation de mon master 2 à Paris. Tes petits plats du week-end, transportés dans le métro parisien ont été un régal, et ont fait de nombreux jaloux parmi les adeptes du sandwich Sodebo. Encore merci. Pour finir, je suis impatiente de démarrer une nouvelle aventure avec toi à Londres !

Je tiens aussi à dire merci à mes premiers encadrants de stage, Madame Cathy Staedel et Monsieur Jean-Max Pasquet. Cathy, je vous remercie de m'avoir fait confiance pour mon stage de L3, alors que je ne réalisais pas mes études sur Bordeaux, de m'avoir aussi bien accueillie dans l'équipe et dans le projet, et surtout de m'avoir fait découvrir le monde des miARNs. Jean-Max, je vous remercie pour votre encadrement lors du stage de M1, pour vos encouragements, et pour toutes les discussions que nous avons eues. C'est aussi grâce à vos expériences et encadrement respectifs à tous les deux que j'ai réussi à aller jusqu'à la réalisation d'une thèse. Merci beaucoup à vous.

Je vais finir en remerciant les colocataires avec qui j'ai partagé ces deux dernières années: Margaux, Alba, Jordan, Alice et Valentin. Merci d'avoir partagé mon quotidien, et surtout merci d'avoir été compréhensifs, et de ne pas s'être trop moqué de ma dégaine durant la période d'écriture, quand j'étais « habillée avec mon pyjama d'intérieur ». J'espère vous revoir par la suite, et vous souhaite une super bonne continuation!

Un très grand merci à tous!

Avant propos

Cet avant propos est destiné à bien appréhender le contexte dans lequel ma thèse s'est déroulée, ainsi que les différentes hypothèses de travail qui ont été déclinées.

J'ai réalisé ma thèse sous la direction du Dr. Alexandre Favereaux, qui s'intéresse aux mécanismes de la régulation de l'expression des gènes par les microARNs dans le système nerveux, en contexte physiologique et pathologique. Ces petits régulateurs qui répondent au nom de microARNs, sont le fil conducteur de mes 4 ans de thèse. Mon travail se divise en 4 études différentes, dans lesquelles nous avons étudié les microARNs essentiellement en contexte physiologique.

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, j'ai participé aux révisions du travail réalisé en partie par mon prédécesseur, le Dr. Sara Elramah, qui s'est intéressée au rôle régulateur d'un microARN spécifique, dans un paradigme de plasticité synaptique homéostatique. Je démarrerai le manuscrit par l'explication de ce travail dans le chapitre 1. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Olivier Thoumine, qui fait partie de notre institut à Bordeaux.

L'un des modèles animaux de prédilection dans les études de neurosciences en laboratoire est le rat. Nous avons remarqué que les bases de données qui référencent les différents microARNs sont moins complètes chez le rat, comparé à la souris ou à l'Homme. Nous avons donc réalisé une étude de RNA-Seq pour déterminer le miRNome complet de 5 structures importantes du système nerveux central, afin de faciliter les études futures réalisées sur les microARNs dans le système nerveux. Cette étude fera l'objet du chapitre 2.

Les microARNs, qui sont synthétisés par une cellule, et régulent l'expression de ses propres gènes, peuvent également être transportés d'une cellule à l'autre au travers de vésicules extracellulaires. L'échange de microARNs via les vésicules extracellulaires est décrit comme étant un nouveau mécanisme de communication intercellulaire. Nous avons cherché à le décrire dans le système nerveux, dans lequel il est peu étudié. Ce travail sera présenté dans le chapitre 3.

Enfin, le système nerveux est composé des neurones, mais également des cellules gliales, qui sont démontrées pour jouer un rôle indispensable dans la communication neuronale. Nous trouvons pertinent d'étudier la communication cellulaire qui s'exerce entre tous les types de cellules du système nerveux via les vésicules extracellulaires, afin de mieux comprendre leurs rôles respectifs. Pour cela, nous avons cherché à développer un nouvel outil de purification des vésicules extracellulaires en fonction de leur origine cellulaire. Les stratégies mises en œuvre pour développer et mettre au point cet outil seront décrites et expliquées dans la dernière partie du manuscrit, le chapitre 4.

Table des matières

ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	3
CHAPITRE 1 : LES MIARNs ET LEUR ROLE DANS LA REGULATION DE LA PLASTICITE SYNAPTIQUE.	6
1. INTRODUCTION.	6
1.1. <i>Les miRNAs appartiennent à la classe des petits ARNs régulateurs non-codants.</i>	6
1.2. <i>Les miARNs, des régulateurs importants de l'expression des gènes.</i>	9
1.2.1. La découverte des miARNs.	9
1.2.2. Les miARNs, des régulateurs de l'expression génétique en condition physiologique et pathologique.	10
1.3. <i>La biogénèse des miARNs.</i>	11
1.3.1. L'organisation génomique des miARNs.	11
1.3.2. La transcription des gènes de miARNs.	16
1.3.3. Les étapes de maturation.	16
1.3.3.1. La première étape de maturation : l'intervention de l'enzyme DROSHA.	16
1.3.3.2. La deuxième étape de maturation : l'intervention de l'enzyme DICER.	17
1.4. <i>La reconnaissance des ARNm cibles par les miARNs.</i>	19
1.4.1. Les mécanismes de la reconnaissance.	19
1.4.1.1. La reconnaissance s'effectue par l'appariement de bases complémentaires.	19
1.4.1.2. Les miARNs reconnaissent principalement la partie 3'UTR des ARNm.	20
1.4.2. Le multi-ciblage.	21
1.5. <i>La prédiction des ARNm cibles des miARNs</i>	23
1.5.1. Les méthodes de prédiction des ARNm cibles des miARNs.	23
1.5.2. Les algorithmes de prédiction des cibles.	23
1.6. <i>Les modes d'action des miRNAs.</i>	25
1.6.1. Les miARNs, des inhibiteurs de la traduction des ARNm.	25
1.6.1.1. Clivage de l'ARNm.	27
1.6.1.2. Inhibition de la traduction de l'ARNm.	27
1.6.2. Les miARNs peuvent être des activateurs de la traduction des ARNm.	31
1.6.3. Comment expliquer tous ces mécanismes différents ?	32
1.7. <i>Comment réguler ces régulateurs ?</i>	34
1.7.1. Régulation de la transcription des miARNs.	34
1.7.2. Régulation de la première étape de maturation : le microprocesseur Drosha/DGCR8.	35
1.7.3. Régulation de l'export dans le cytoplasme.	35
1.7.4. Régulation de la deuxième étape de maturation : DICER et AGO.	36
1.7.4.1. La modulation de DICER.	36
1.7.4.2. Le contrôle des protéines AGO.	36
1.7.5. Régulation des miARNs matures.	37
1.7.5.1. La stabilité et l'efficacité d'action des miARNs.	37
1.7.5.2. Séquestration et l'élimination des miARNs.	38
1.8. <i>La nomenclature des miARNs.</i>	38
1.9. <i>Les miRNAs dans le système nerveux central.</i>	40
1.9.1. Description du système nerveux central.	40
1.9.1.1. Brève définition du système nerveux central.	40
1.9.1.2. La communication neuronale s'effectue via les synapses.	40
1.9.1.3. Principe de la transmission synaptique excitatrice.	41
1.9.1.4. La plasticité neuronale et synaptique : l'adaptation du neurone et de la synapse à l'activité. ...	43
1.9.1.5. La plasticité synaptique requiert des mécanismes de régulation locaux.	45
1.9.2. L'expression des miRNAs dans le système nerveux central.	46
1.9.3. Les miARNs et la plasticité neuronale.	47
1.9.3.1. L'expression des miRNAs est régulée par l'activité des neurones.	47
1.9.3.2. Les miRNAs sont des acteurs de la régulation de la plasticité synaptique.	51
1.9.3.2. Les miARNs et la plasticité homéostatique.	56

1.10. La problématique de l'étude : les miARNs participent-ils aux mécanismes de plasticité homéostatique dans les neurones d'hippocampe chez le rat ?.....	57
2. MANUSCRIT 1 : MIR-92A REGULATES EXPRESSION OF SYNAPTIC GLUA1-CONTAINING AMPA RECEPTORS DURING HOMEOSTATIC SCALING.	58
3. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.	71
3.1. Les miARNs, de nouveaux acteurs dans la régulation de la plasticité homéostatique.	71
3.2. L'expression de miR-92a est régulée par l'activité neuronale, mais comment ?.....	73
3.3. Un travail en collaboration que se poursuit avec l'équipe d'Olivier Thoumine.	74

CHAPITRE 2 : DETERMINATION DU MIRNOME DE 5 STRUCTURES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL. 78

1. INTRODUCTION.	78
1.1. Définition du miRNome.	78
1.2. Le référencement des miRNAs.	78
1.2.1. La base de données miRBase.	78
1.2.2. Implémentation différente selon les espèces de miRBase.	78
1.3. Les technologies de détection et quantification des miARNs, et de découverte de nouvelles espèces de miARNs.	79
1.3.1. Les principales techniques de détection et de quantification des miARNs.	79
1.3.2. Le RNA-Seq, une méthode de quantification très sensible, et de découverte de nouveaux miARNs.	81
1.4. A la découverte de nouveaux miRNAs.	86
1.4.1. Les algorithmes de prédiction pour la découverte de nouveaux miRNAs.	86
1.4.1.1. Les programmes miRDeep et miRDeep2.	86
1.4.1.2. Le programme miRPro.	89
1.4.2. Découverte de miRNAs non conventionnels grâce aux techniques de RNA-Seq : les isomiRs.	91
1.5. Les miARNs participent à définir les spécificités des différentes structures du SNC.	93
1.5.1. Le SNC exprime des miARNs particuliers.	93
1.5.2. Certains miARNs sont spécifiques de régions du SNC.	94
1.6. Problématique de l'étude.	96
2. MANUSCRIT 2 : RNA-SEQ REVEALS NOVEL MIRNAS SHAPING THE TRANSCRIPTOMIC IDENTITY OF RAT BRAIN STRUCTURE.	97
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.	155
3.1. Le RNA-Seq permet la découverte de nouvelles espèces de miARNs.	155
3.2. Les miARNs, la signature de la spécificité du transcriptome des structures du SNC.	156
3.3. Comment expliquer la différence d'expression des miARNs entre les structures du SNC ? .	158

CHAPITRE 3 : LES MIRNAS SONT ECHANGES ENTRE LES CELLULES DU SYSTEME NERVEUX VIA LES VESICULES EXTRACELLULAIRES, ET SONT IMPLIQUES DANS LES MECANISMES DE REGULATION DE LA PLASTICITE NEURONALE. 161

1. INTRODUCTION.	161
1.1. Les vésicules extracellulaires.	161
1.1.1. L'histoire de la découverte des vésicules extracellulaires.	161
1.2. La biogénèse des vésicules extracellulaires.	162
1.2.1. La biogénèse des exosomes.	162
1.2.1.1. La création du MVB via la machinerie ESCRT.	164
1.2.1.2. Les autres acteurs de la formation des MVBs.	166
1.2.1.3. La fusion du MVB avec la membrane plasmique.	167
1.2.2. La biogénèse des microvésicules.	168
1.3. La libération des vésicules extracellulaires dans le milieu extérieur : un mécanisme constitutif ou inductible ?	170
1.4. La recapture des vésicules extracellulaires par les cellules receveuses.	171
1.4.1. L'interaction ligand-récepteur entre les EVs et la membrane plasmique de la cellule receveuse.	172

1.4.2. La fusion des EVs avec la membrane plasmique.....	173
1.4.3. L'internalisation des EVs par endocytose.....	174
1.4.4. Le transport intracellulaire des EVs dans les cellules receveuses.....	176
1.5. La composition des vésicules extracellulaires.....	177
1.5.1. La composition des EVs en lipides.....	178
1.5.2. La composition des EVs en protéines.....	178
1.5.3. La composition des EVs en acides nucléiques.....	179
1.5.4. Des bases de données dédiées à l'étude des EVs.....	180
1.6. La sélection des cargos des EVs.....	181
1.7. Les vésicules extracellulaires dans le SNC.....	183
1.7.1. Le SNC : la co-existence de divers types cellulaires.....	183
1.7.1.1. Les neurones.....	183
1.7.1.2. Les oligodendrocytes.....	184
1.7.1.3. Les astrocytes.....	184
1.7.1.3. Les microglies.....	184
1.7.2. Les EVs sont libérées par tous les types cellulaires du SNC.....	185
1.7.3. Le rôle des EVs dans le SNC en condition physiologique.....	185
1.7.3.1. Le rôle des EVs dans la communication neuronale.....	185
1.7.3.2. Les EVs dans la jonction neuromusculaire de la drosophile.....	186
1.7.3.3. Le rôle des EVs dans la communication neurone-glie.....	187
1.7.3.4. Les EVs dans la communication avec la périphérie.....	189
1.8. Le rôle des EVs dans les maladies neurodégénératives et les tumeurs cérébrales.....	190
1.9. La communication dans le SNC par le transfert de miARNs contenus dans les vésicules extracellulaires.....	190
1.10. La problématique de l'étude : le transfert de miARNs dans les EVs participe-t'il à la régulation de la plasticité neuronale ?.....	193
2. MANUSCRIT 3 : EXTRACELLULAR VESICLES RELEASED BY HIPPOCAMPAL CULTURES CONTAIN A MIRNA REPERTOIRE REGULATED BY NEURONAL ACTIVITY WHICH INDUCES TRANSCRIPTOMIC REGULATIONS IN RECIPIENT CELLS.....	194
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	239
3.1. Les cellules du SNC libèrent des EVs : localisation, dynamique ?.....	239
3.2. Développement d'un protocole d'activation neuronal physiologique dans les cultures primaires.....	242
3.3. L'étude des miARNs contenus dans les EVs : un sujet complexe.....	243
3.5. Le transfert de miARNs dans les EVs : un nouveau mécanisme de régulation de la plasticité neuronale ?.....	246

CHAPITRE 4 : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE PURIFICATION DES VESICULES EXTRACELLULAIRES SELON L'ORIGINE DU TYPE CELLULAIRE.....

1. INTRODUCTION.....	250
1.1. Les principales techniques de purification des vésicules extracellulaires.....	250
1.1. L'ultracentrifugation, la méthode phare.....	250
1.2. L'immuno-purification.....	251
1.3. La chromatographie à exclusion de taille.....	252
1.4. Les solutions de précipitation commerciales.....	252
1.5. Quelques points de comparaison des différentes méthodes de purification.....	253
1.2. L'intérêt d'une purification cellule spécifique des vésicules extracellulaires dans le système nerveux.....	254
1.2.1. La synapse tri-partite : le neurone pré-synaptique, post-synaptique, et l'astrocyte.....	254
1.2.2. L'hypothèse de la synapse quadri-partite : les neurones pré-synaptique, post-synaptique, l'astrocyte, et la microglie.....	256
1.3. La problématique de l'étude.....	257
2. MATERIEL ET METHODES.....	259
2.1. Stratégie de clonage.....	259
2.2. Création des virus.....	260
2.3. Cultures cellulaires.....	260

2.3.1. La lignée HEK 293.	260
2.3.2. Les cultures primaires d'hippocampe de rat.	260
2.4. <i>Immunocytochimie</i>	261
2.5. <i>Insertion des plasmides dans les cellules</i>	261
2.5.1. Lipofection dans la lignée HEK 293.	261
2.5.2. Electroporation dans les cultures primaires d'hippocampe.	262
2.5.3. Infection des cultures primaires d'hippocampe.	262
2.6. <i>Western blot</i>	262
2.7. <i>RT qPCR</i>	263
2.9. <i>Immunopurification</i>	263
3. RESULTATS.	264
3.1. <i>La stratégie n°1</i>	264
3.2. <i>La stratégie n°2</i>	266
3.3. <i>La stratégie n°3</i>	268
3.4. <i>La stratégie n°4</i>	269
4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.	272
OUVERTURE GENERALE ET CONCLUSION DE LA THESE	274
1. LES MIARNs ET LES EVs POUR UN DIAGNOSTIQUE CLINIQUE DES PATHOLOGIES CEREBRALES.	274
2. LES MIARNs ET LES EVs COMME OUTILS THERAPEUTIQUES.	275
3. CONCLUSION GENERALE.	277
CURRICULUM VITAE	279
BIBLIOGRAPHIE	282

Abréviations

ADNc : ADN complémentaire
Ago : Argonaute
AMPA : α -amino-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
APV : *D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid*- antagoniste spécifique des récepteurs NMDA
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*
CAMK : Ca^{2+} / *calmodulin-dependant protein kinase*
DGCR8 : *Di George syndrome critical region 8*
EVs : *extracellular vesicles*- vésicules extracellulaires
ESCRT : *endosomal sorting complex required transport*
GFAP : *glial fibrillar acidic protein*
GFP : *green fluorescent protein*
ILV : *intraluminal vesicles* – vésicules intraluminales
IRES : *internal ribosome entry site*
KCl : *potassium chloride*
KD : *knock down*
kDa : kilo Dalton
KO : *knock out*
LCR : liquide céphalo-rachidien
Lamp : *lysosome associated membrane protein*
LTD : *long-term depression*
LTP : *long-term potentiation*
TTX : *tetrodotoxin*
miARN : microARN
MOI : *multiplicity of infection*
MVB : *multivesicular body* – corps multivésiculaire
NGS : *Next-generation sequencing* –séquençage de nouvelle génération
nm : nanomètre
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
nt : nucléotide
ORF : *open reading frame* – région codante
pb : paires de bases
PCR : *polymerase chain reaction*
piARN : piwi ARN
P-bodies : *Processing-bodies*
Poly(A) : poly-adénylé
Pre-miARN : miARN précurseur
Pri-miARN : microARN primaire
RISC : *RNA-induced silencing complex*
RLC : *RISC loading complex*
RNA-Seq : séquençage d'ARN
RT qPCR : *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*
SEP : *super-ecliptic pHluorin*
siARN : *small interfering RNA*- ARN interférants

SNC : système nerveux central

SMase : sphingomyélinase

SUMO : *small ubiquitin like modifier*

snARN : *small nuclear RNAs*- petits ARN nucléaires

snoARN : *small nucleolar RNA*- petits ARNs nucléolaires

TIRF : *total internal reflection fluorescent microscopy*

TU : *polycistronic transcription unit*

UTR : *untranslated region* – région non-codante

Liste des figures et tableaux

FIGURES

Chapitre 1

Figure 1 : Répartition et rôle des ARNs dans une cellule de mammifère.....	6
Figure 2: <i>Présentation des différentes localisations des gènes de miRNAs.</i>	12
Figure 3: <i>Voie de biogénèse des miARNs.</i>	14
Figure 4: <i>Présentation de la famille de protéines AGO.</i>	18
Figure 5: <i>Représentation de l'appariement entre un miARN et son ARNm cible chez les métazoaires.</i>	20
Figure 6: <i>Multi-ciblage des ARNm par plusieurs miARNs.</i>	22
Figure 7: <i>Les principaux mécanismes de répression de la traduction des ARNm médiés par les miARNs chez les animaux.</i>	27
Figure 8: <i>Représentation schématique de la synapse chimique et électrique.</i>	41
Figure 9: <i>Représentation schématique de la transmission synaptique excitatrice dans une synapse chimique.</i> ... 42	
Figure 10: <i>Schéma représentant les mécanismes principaux de plasticité synaptique homéostatique dans une synapse excitatrice.</i>	44
Figure 11 : <i>Schéma récapitulatif des miARNs impliqués dans la plasticité synaptique et leur rôle.</i>	53
Figure 12: <i>Résultat de RT qPCR pour quantifier l'expression de la Nlg3 et des miARNs cibles.</i>	75
Figure 13: <i>Représentation de la quantification par RT qPCR de l'expression de miR-124 et de l'ARNm de la Synaptopodine.</i>	76

Chapitre 2

Figure 14: <i>Représentation générale de l'intérêt des techniques de NGS.</i>	83
Figure 15: <i>Comparaison des grandes étapes du RNA-Seq pour l'ARNm et les miARNs avec la technologie Illumina.</i>	85
Figure 16: <i>Représentation schématique du mode d'action de l'algorithme miRDeep dans la reconnaissance des séquences de miARNs.</i>	87
Figure 17: <i>Représentation schématique de l'analyse bioinformatique des résultats de RNA-Seq de miARNs avec miRPro.</i>	90
Figure 18: <i>Représentation des différentes classes d'isomiRs.</i>	92
Figure 19: <i>Synthèse schématique du miRNome spécifique par structure du SNC chez le rongeur.</i>	95
Figure 20 : <i>Comparaison des miARNs enrichis avec la littérature.</i>	157

Chapitre 3

Figure 21: <i>Représentation schématique de la biogénèse des exosomes et des microvésicules, avec les principaux acteurs moléculaires.</i>	163
Figure 22: <i>Mode d'action du complexe ESCRT dans la création des ILVs du MVB.</i>	165
Figure 23: <i>Représentation des stimuli favorisant la libération des exosomes et des microvésicules.</i>	170
Figure 24: <i>Mécanismes principaux de recapture des EVs par les cellules receveuses.</i>	172
Figure 25: <i>Représentation des différentes voies d'endocytose.</i>	175
Figure 26: <i>Représentation schématique de la composition des vésicules extracellulaires.</i>	177
Figure 27: <i>Représentation des rôles principaux des EVs dans le SNC.</i>	189
Figure 28 : <i>Représentation du principe de la construction CD63-SEP-mCherry.</i>	241
Figure 29: <i>Test préliminaire de transfert des miARNs vésiculaires vers les cellules receveuses.</i>	247
Figure 30: <i>Représentation de la synapse tripartite.</i>	255
Figure 31: <i>Représentation de la synapse quadripartite.</i>	257

Chapitre 4

Figure 32: <i>Présentation de la stratégie de l'outil de purification des EVs selon l'origine cellulaire.</i>	264
Figure 33: <i>Version n°1 de l'outil de purification.</i>	265
Figure 34: <i>Immunocytochimie contre GFP.</i>	266
Figure 35: <i>Version n°2.</i>	267
Figure 36: <i>Version n°3.</i>	268

Figure 37: <i>Version n°4</i>	269
Figure 38: <i>Résultats des premiers tests d'immunopurification sur les cellules HEK 293</i>	271

TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1: <i>Synthèse concernant les caractéristiques principales des 3 espèces de petits ARNs non codants exprimés chez les eucaryotes</i>	8
Tableau 2: <i>Présentation des principaux neurotransmetteurs du SNC évoqués dans la thèse</i>	43
Tableau 3: <i>Principaux miARNs impliqués dans des mécanismes de plasticité neuronale</i>	54

Chapitre 2

Tableau 4: <i>Comparaison des caractéristiques principales des différentes méthodes de détection et de quantification des miARNs</i>	80
--	----

Chapitre 3

Tableau 5: <i>Présentation des sous-unités de la machinerie ESCRT et leurs fonctions associées</i>	164
--	-----

Chapitre 4

Tableau 6: <i>Présentation des protocoles généraux d'ultracentrifugation pour les exosomes et les microvésicules</i>	251
Tableau 7: <i>Comparaison des méthodes de purification des EVs</i>	253
Tableau 8: <i>Anticorps utilisés pour l'immunocytochimie</i>	261
Tableau 9: <i>Anticorps utilisés pour le Western blot</i>	263

Ouverture

Tableau 10: <i>Les EVs, un vecteur thérapeutique d'avenir ?</i>	276
---	-----

CHAPITRE 1

Les microARNs et leur rôle dans la
régulation de la plasticité synaptique.

Chapitre 1 : Les miARNs et leur rôle dans la régulation de la plasticité synaptique.

1. Introduction.

1.1. Les miRNAs appartiennent à la classe des petits ARNs régulateurs non-codants.

La composition en ARN d'une cellule de mammifère modèle est constituée en majorité d'ARNs qui ne codent pas pour des protéines (ces derniers représentent 98% du transcriptome chez l'Homme (Shruti et al., 2011)) (Figure 1).

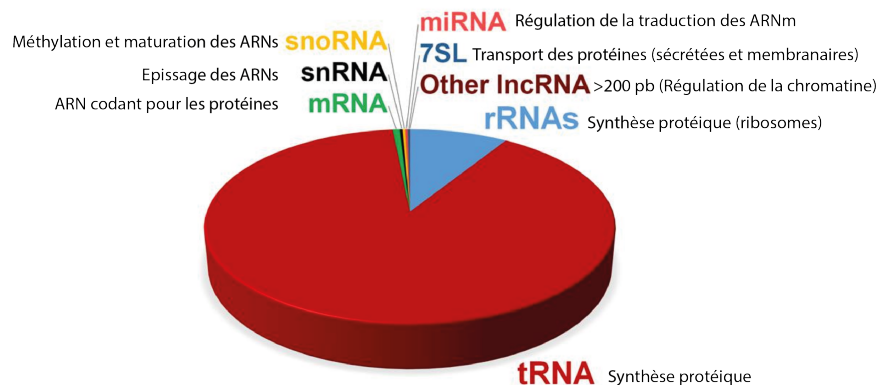


Figure 1: Répartition et rôle des ARNs dans une cellule de mammifère.

Ce graphique représente la répartition des différentes espèces d'ARNs dans une cellule somatique de mammifère. A ces ARNs s'ajoutent les piwiARNs, présents principalement dans les cellules des gonades et du système nerveux, et les ARNs circulaires, aussi présents très majoritairement dans le système nerveux, et qui exercent une fonction d'éponge naturelle pour les miARNs. Les ARNs circulaires seront introduits au chapitre 1, paragraphe 1.9.3.1. Ce graphique est issu de : (Palazzo and Lee, 2015).

Les ARNs non-codants peuvent être classés en deux grands groupes (Wu et al., 2016) :

- Les ARNs dits de ménage, qui sont exprimés de manière constitutive et jouent des rôles critiques dans la biosynthèse protéique. Cette classe est constituée des ARNs ribosomiques (ARNr), de transfert (ARNt), nucléaires (snARN), et des petits RNAs nucléolaires (snoARN).

- Les ARNs **régulateurs** qui sont impliqués dans la modulation de l'expression des gènes. Ils sont constitués des **petits ARNs non codants** (Kim, 2005), et des longs ARNs non codants (>200nt). Le rôle principal des longs ARNs non codants est la régulation de la chromatine (Quinodoz and Guttman, 2014; Wu et al., 2016).

Les petits ARNs non codants, qui ont une taille comprise entre 18 et 30 nucléotides en moyenne, sont les acteurs clés du **mécanisme de l'inhibition des gènes** (ou *gene silencing* en anglais) (Kim, 2005). C'est une voie de régulation dans laquelle la formation d'un double brin d'ARN interfère avec l'expression des gènes, en inhibant une séquence spécifique. Au niveau moléculaire, elle est médiée par une famille de ribo-nucléo-protéines, nommée RISC (pour *RNA-induced silencing complex*) (Pratt and MacRae, 2009). Selon la nature de l'ARN incorporé dans le complexe RISC, ainsi que le type cellulaire dans lequel s'exerce la régulation, le mécanisme de régulation du gène ciblé peut s'effectuer (Pratt and MacRae, 2009) :

- au niveau de la synthèse protéique à travers une répression de la traduction,
- au niveau du transcrit du gène, via la dégradation de l'ARNm,
- au niveau du génome lui-même à travers la formation d'hétérochromatine, ou par l'élimination d'une partie de l'ADN.

Il existe 3 types de petits ARNs non codants distincts exprimés chez les eucaryotes: les microRNAs (miARNs), les petits ARNs interférants (siARN pour *small interfering RNAs* en anglais), et les piwi ARNs (piARNs). Ils se distinguent par leur biogénèse, leur mécanisme d'action, et le type cellulaire dans lequel ils agissent (Tableau 1). Brièvement, les miARNs et les siARNs ne sont souvent pas distinguables sous leur forme mature, ces deux classes se différencient majoritairement selon leur biogénèse. Les miARNs sont générés à partir de la région double brin d'un ARN précurseur en forme d'épingle, alors que les siARNs viennent d'un long double brin d'ARN (Kim, 2005). De plus, les siARNs, très exprimés dans les cellules végétales, sont souvent considérés comme étant peu exprimés de manière endogène dans les cellules de mammifère, même si quelques études montrent des exemples (ils sont alors nommés en anglais « *endogenous siRNA* » (Hombach and Kretz, 2016)). Les piARNs, quant à eux, sont principalement exprimés dans les cellules germinales, où leur rôle principal est d'inhiber l'activité des éléments transposables (Mani and Juliano, 2013; Zuo et al., 2016).

Tableau 1: Synthèse concernant les caractéristiques principales des 3 espèces de petits ARNs non codants exprimés chez les eucaryotes.

	Type cellulaire	Biogénèse	Mécanisme d'action	Références
miARNs	Tous	Clivage en deux étapes par les enzymes Drosha et Dicer.	Inhibition de la traduction, clivage de l'ARNm.	(Bartel, 2004; Kim, 2005; Tolia and Joshua-Tor, 2007)
siARNs	Tous (peu exprimés chez les mammifères de manière endogène)	Clivage par Dicer	Clivage de l'ARNm, modification des histones et ou de l'ADN.	(Claycomb, 2014; Siomi and Siomi, 2009)
piARNs	Principalement les cellules germinales, détectés dans quelques types de cellules somatiques.	Peu connue, sûrement via la modification de transcrits, puis modèle dit en ping-pong pour l'amplification.	Mécanisme peu clair, mais la fonction principale est la suppression de l'activité des éléments transposables, et la méthylation de l'ADN.	(Tolia and Joshua-Tor, 2007; Watanabe et al., 2011; Zuo et al., 2016)

1.2. Les miARNs, des régulateurs importants de l'expression des gènes.

Les miARNs sont des petits ARNs endogènes simple brin, d'une longueur comprise entre 18 et 22 nucléotides. Ils exercent principalement une régulation post-transcriptionnelle négative de l'expression des gènes en ciblant la partie 3' UTR (*untranslated region* = région non codante) des ARN messagers (ARNm) (Bartel, 2004).

1.2.1. La découverte des miARNs.

La découverte des miARNs est relativement jeune, puisqu'elle date de moins de 30 ans. En 1993, deux groupes de recherche indépendants (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) ont mis en évidence qu'un petit ARN de 21 nucléotides, nommé *lin-4*, contrôle les phases de développement chez *Caenorhabditis elegans*, par un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle du gène *lin-14*. Ces études montrent que *lin-4* ne code pas pour une protéine, et contient une séquence anti-sens complémentaire d'une séquence répétée qui se situe dans la partie 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm de *lin-14*. Ces deux groupes émettent l'hypothèse que le petit ARN *lin-4* inhibe l'expression du gène *lin-14* via une interaction anti-sens ARN-ARN. Cependant, à cette époque, les scientifiques ont peu prêté attention à cette nouvelle classe de petits ARNs, ou alors ils l'ont considérée comme une particularité de l'organisme *C. elegans* (Zhang et al., 2007).

Près de 7 ans après cette première découverte, un autre petit ARN régulateur a été mis en évidence, toujours chez *C. elegans* : *let-7*. Tout comme *lin-4*, *let-7* régule l'expression de gènes qui contrôlent les étapes de développement et de différenciation cellulaire, et en particulier celui de *lin-41* (Reinhart et al., 2000). De manière très intéressante, à la fois la séquence de *let-7*, ainsi que son rôle dans la détermination du patron développemental, sont trouvés comme étant très conservés chez diverses espèces, incluant les vertébrés, les ascidies, les hémicordés, les mollusques, les annélides et les arthropodes (Pasquinelli et al., 2000). Ce résultat suggérait que *let-7* jouait un rôle très important dans le processus biologique développemental, ou tout du moins un rôle plus important qu'il n'apparaissait à l'époque.

Ce travail a attiré l'attention de nombreux scientifiques, et a notamment donné lieu en 2001 à la publication de 3 papiers dans le célèbre journal Science. Ces travaux relatent la découverte d'un grand nombre de nouveaux petits ARNs similaires à *lin-4* et *let-7*, qui ont été identifiés à la fois chez les vertébrés et chez les invertébrés, et qui régulent divers processus biologiques (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros,

2001). C'est à ce moment que la classe de petits ARNs régulateurs fut officiellement identifiée, et nommée miARNs. Le terme de miARNs remplace le nom initial de petits ARNs temporels (*small temporal RNA* en anglais) donné aux deux membres fondateurs *lin-4* et *let-7* car ils apparaissaient au cours du temps pendant le développement de *C. elegans* (Pasquinelli et al., 2000).

1.2.2. Les miARNs, des régulateurs de l'expression génétique en condition physiologique et pathologique.

Depuis leur découverte, les études sur les miARNs ne cessent de croître, et aujourd'hui de nombreuses espèces différentes de miARNs sont référencées chez tous les organismes modèles. La principale base de données libre d'accès qui répertorie les miRNAs est miRBase (Griffiths-Jones, 2006). Par exemple, en 2017, d'après cette base de données, 1915 miRNAs matures différents ont été découverts chez la souris (*mus musculus*) (GRCm38), et 2588 chez l'Homme (*homo sapiens*) (GRCh38).

Des études estiment que les miARNs sont capables de réguler entre 30 et 60% des gènes chez les mammifères (Chekulaeva and Filipowicz, 2009; Filipowicz et al., 2008; Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2005), confirmant leur rôle indéniable dans la détermination du protéome de la cellule. Ils sont aujourd'hui connus pour être impliqués dans la régulation de l'ensemble des processus biologiques, aussi bien dans un contexte physiologique que pathologique. Plus particulièrement, leur rôle est bien décrit dans les étapes de développement, de différenciation cellulaire, de prolifération, et d'apoptose (Vidigal and Ventura, 2015), mais aussi dans le développement et la progression des pathologies comme les cancers (Oliveto et al., 2017).

La dérégulation de certains miARNs en cas de maladie en fait des cibles d'intérêt pour la thérapeutique. D'une part, ils peuvent servir de bio-marqueurs de l'apparition et de la progression de certaines maladies. En effet, certains sont montrés comme étant spécifiquement sur- ou sous-exprimés en condition pathologique comparé à la condition saine. C'est notamment le cas des miR-21, miR-17-5p et miR-191 qui sont tous les trois co-dérégulés dans des cancers de différentes origines cellulaires (Jackson and Linsley, 2010). Ils sont ainsi considérés comme des marqueurs pertinents de l'apparition de cellules cancéreuses. D'autre part, les miARNs peuvent servir de cible thérapeutique. Par exemple, une étude montre le potentiel anti-viral de l'injection d'un anti-miR-122 en cas d'infection chronique du virus de l'hépatite C chez le primate (Lanford et al., 2010). Un anti miR-122

est maintenant testé pour de la thérapeutique humaine, et est actuellement en essai clinique de phase II (Janssen et al., 2013).

Ainsi, les miARNs sont des acteurs fondamentaux de la régulation de l'expression des gènes, tant au niveau physiologique que pathologique, et ce chez tous les êtres vivants.

1.3. La biogénèse des miARNs.

1.3.1. L'organisation génomique des miARNs.

Tous les chromosomes humains contiennent des miARNs, à l'exception du chromosome Y (Ul-Hussain, 2012). Cette observation est aussi valable pour les autres espèces. Il y a presque 20 ans, les approches computationnelles, dont les deux outils les plus sensibles sont miRscan (Lim et al., 2003a, 2003b) pour les vertébrés et le nématode, et miRseeker (Lai et al., 2003) pour les invertébrés, estimaient que les miARNs représentaient environ 1% des gènes d'un organisme comparé au nombre total de gènes qui codent pour des protéines (Bartel, 2004; Lai et al., 2003; Lim et al., 2003b; Zhang et al., 2007). Chez l'Homme en 2010, les estimations s'élèvent à 1,5% des gènes (Alexander et al., 2010). En 2017, d'après les bases de données miRbase et Ensembl qui référencent respectivement les miARNs et les ARNm pour chacune des espèces, les miARNs représentent 8,5% des gènes chez l'Homme.

Les gènes des miARNs ont été classés selon leur position dans le génome en 3 grandes catégories (Figure 2) (Rodriguez et al., 2004) :

- **Intergénique** : ce sont les gènes de miARNs qui se situent dans des régions génomiques distinctes de celles connues pour être des unités de transcription fonctionnelles, et peuvent être monocistroniques ou polycistroniques. Ils possèdent leurs propres promoteurs et autres éléments régulateurs. Cette catégorie représente 50% des gènes codants pour des miARNs chez les mammifères (O'Carroll and Schaefer, 2013).
- **Intronique** : les gènes des miARNs sont localisés dans les introns de gènes déjà référencés, codants ou non pour une protéine (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee et al., 2002). Cette catégorie représente 40% des gènes (O'Carroll and Schaefer, 2013; Rodriguez et al., 2004). Il a été montré que la localisation de certains gènes introniques de miARNs est conservée

entre plusieurs espèces, démontrant leur rôle important au cours de l'évolution. Par exemple, le miR-7 est trouvé dans l'intron du gène hnRNP K (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein K*), à la fois chez les insectes et chez les mammifères (Aravin et al., 2003). Par ailleurs, dans certains cas, l'intron lui-même provenant d'un gène codant pour une protéine, peut servir de patron pour créer un miARN. La structure de l'intron mime celle du pre-miARN, ainsi l'intron contourne la maturation réalisée par Drosha, et est pris en charge directement par Dicer. De tels introns sont nommés mirtrons (Ruby et al., 2007).

- **Exonique** : les gènes des miARNs se situent en chevauchement entre un exon non codant pour une protéine et un intron d'un gène. Cette catégorie de gènes est bien plus rare que les deux précédentes, et représente 10% d'entre eux. La biogénèse de cette classe reste encore aujourd'hui peu étudiée (O'Carroll and Schaefer, 2013; Rodriguez et al., 2004; Ul-Hussain, 2012).

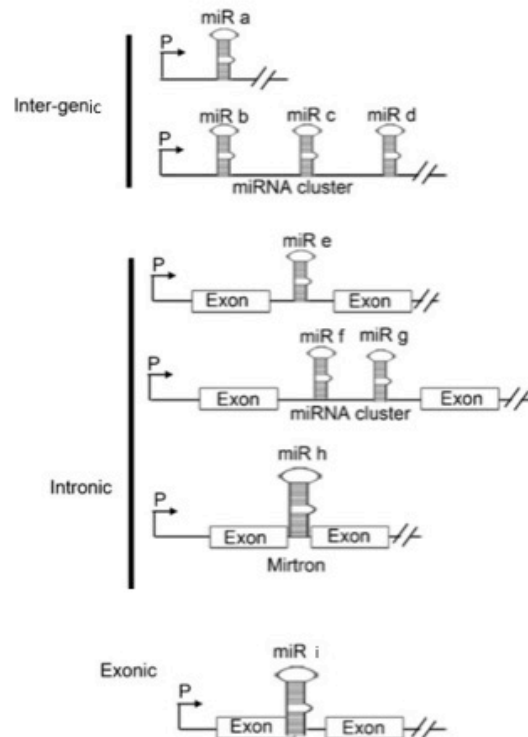


Figure 2: Présentation des différentes localisations des gènes de miRNAs.

Les gènes des miARNs peuvent être intergéniques et posséder leur propre promoteur et éléments de régulation, ou alors introniques, ou exoniques. Cette figure est adaptée de : (Ul-Hussain, 2012).

En plus des catégories précédentes, il a été montré que certains miARNs sont générés à partir des petits ARNs nucléolaires (snoRNAs), qui guident les modifications chimiques d'autres ARNs, comme les ARNr, et les ARNt (Ender et al., 2008).

Chez la catégorie des miARNs intergéniques, les gènes forment souvent une unité indépendante de transcription avec leur propre promoteur et autres éléments de régulation. Par contre, pour les deux autres catégories de gènes de miARNs, leur transcription semble dépendante des promoteurs des gènes dans lesquels ils sont insérés (Bartel, 2004). Cette répartition peut s'expliquer par le fait qu'elle procure un mécanisme astucieux pour la coordination de l'expression d'un miARN et d'une protéine (Bartel, 2004). Cependant, certains miARNs introniques possèdent leur propre promoteur et ainsi leur transcription est indépendante de celle de leur gène hôte (Marsico et al., 2013; Monteys et al., 2010).

L'étude réalisée par Dill et ses collaborateurs illustre le mécanisme de la boucle de régulation qui se réalise lors de la co-expression d'un miARN et de sa cible par la présence du gène du miARN dans l'intron du gène cible. En effet, le travail décrit le rôle du miR-26b dans le contrôle de la différenciation neuronale à travers la régulation de l'expression de son gène hôte CTDSP2 (Dill et al., 2012).

Près de 50% des gènes de miARNs chez les mammifères sont situés à proximité d'autres gènes codant pour des miARNs, et sont ainsi dits être regroupés en clusters. La littérature concernant la distance entre les gènes de miARNs d'un cluster est hétérogène, et propose une distance allant de 50 à 10 000 kb. Dans tous les cas, un cluster de miARNs consiste à la transcription de plusieurs miARNs à partir d'une unité de transcription polycistronique unique (TU pour *polycistronic transcription unit*) (Kim et al., 2009; Lee et al., 2002). Les miARNs regroupés en clusters ont souvent (mais pas toujours), une relation entre eux, c'est à dire qu'ils vont réguler les mêmes gènes ou une même famille de gènes (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001). C'est par exemple le cas du cluster miR-17-92, qui code pour 7 miARNs différents (miR-17-5p, -17-3p, -18a, -19a, -20a, -19b, -92-1), et qui est considéré comme un cluster d'oncomiRs car ils régulent des voies de signalisations qui permettent l'initiation et la progression de plusieurs cancers (Xiang and Wu, 2010).

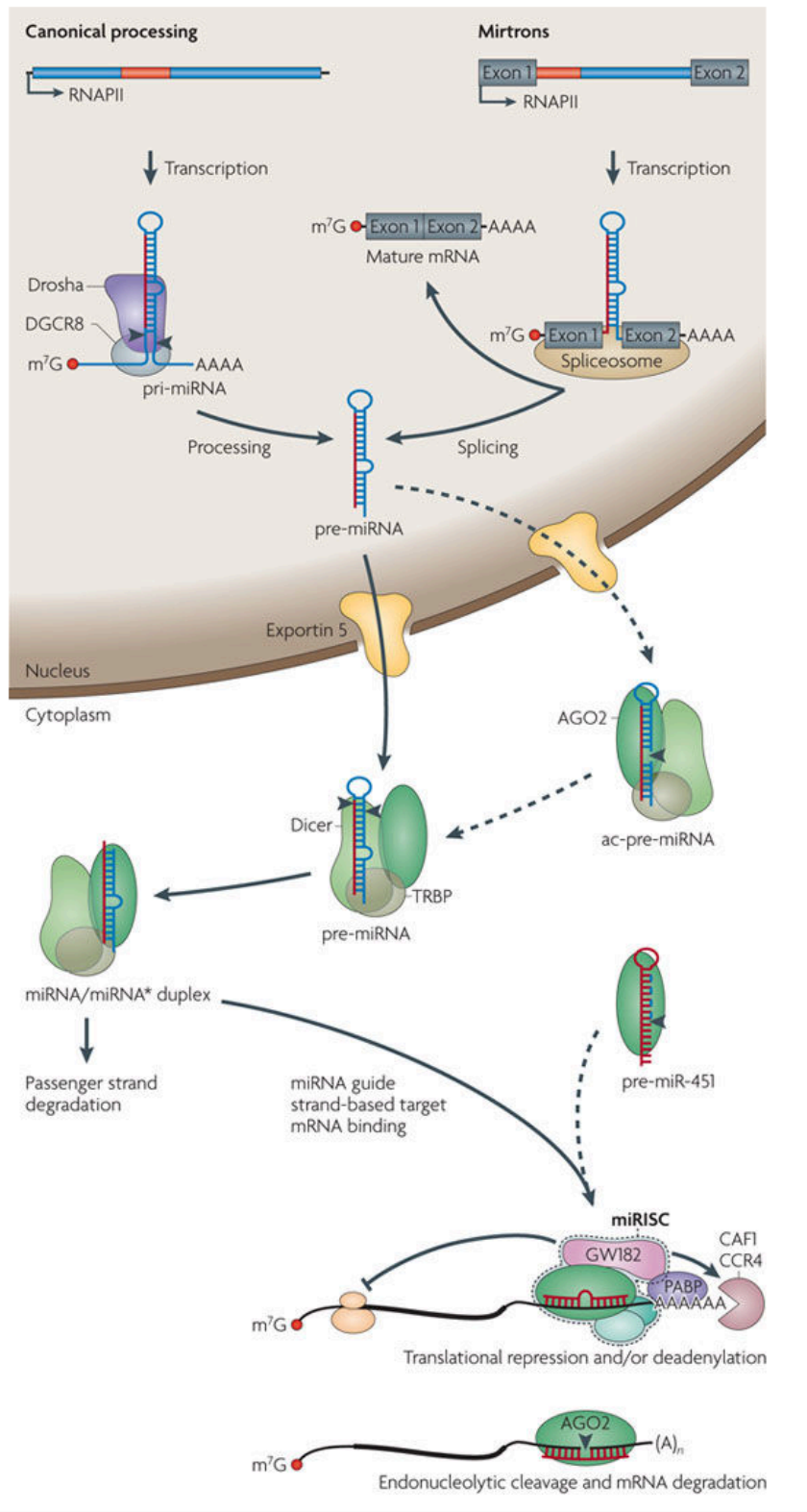


Figure 3: Voie de biogénèse des miARNs.

La voie canonique de biogénèse des miARNs se déroule comme suit : le gène du miARN est transcrit en un miARN primaire qui comporte une structure en tige boucle, une coiffe et une queue poly(A). Ce dernier est mûré dans le noyau par le microprocesseur, composé principalement de

DROSHA et DGCR8, libérant le miARN précurseur. Le pre-miARN est exporté dans le cytoplasme par l'Exportine 5. Il est pris en charge et mûré par l'enzyme DICER, qui élimine la structure en boucle, donnant naissance à un duplex d'ARN. Le brin passager est généralement (mais pas toujours) dégradé, alors que le brin mature du miARN est incorporé dans le complexe RISC, composé d'une protéine AGO. Dans le complexe RISC, le miARN régule ses ARNm cibles. La voie de biogénèse des mirtrons concerne les miARNs dont les gènes sont situés dans les introns de gènes codants pour des protéines. La machinerie d'épissage crée un ARN issu de l'intron qui a une structure similaire au miARN précurseur. Ainsi le microprocesseur n'intervient pas lors de la première étape de maturation. Enfin, le miR-451 est particulier car il ne nécessite pas l'intervention de la protéine DICER, mais est mûré directement par la protéine AGO2. Source : (Krol et al., 2010a; Yang et al., 2010).

1.3.2. La transcription des gènes de miARNs.

Le mécanisme de transcription des gènes de miARNs a été rapporté comme étant similaire à celui des gènes codant pour une protéine (Krol et al., 2010a). Les gènes des miARNs sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004), et parfois par l'ARN polymérase III (Borchert et al., 2006). Un éventail de facteurs de transcription contrôle la transcription des gènes par l'ARN polymérase II, permettant ainsi l'élaboration d'une régulation dépendante du type cellulaire et de la condition cellulaire (Kim et al., 2009).

Les transcrits primaires (pri-miARNs) générés par l'ARN polymérase II font plusieurs kilobases de long, possèdent généralement une coiffe et une queue polyadénylée, et ont une structure secondaire en tige-boucle (Lee et al., 2004). Dans la voie canonique de maturation des miARNs chez les mammifères, le pri-miARN est transformé en miARN mature selon un processus en deux étapes, réalisé successivement par les enzymes DROSHA et DICER, qui appartiennent à la famille des enzymes RNase III (Bartel, 2004) (Figure 3).

1.3.3. Les étapes de maturation.

1.3.3.1. La première étape de maturation : l'intervention de l'enzyme DROSHA.

Dans la voie de maturation canonique, la première étape se réalise dans le noyau, et consiste au clivage du pri-miARN par l'enzyme DROSHA et son co-facteur DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8*), nommé microprocesseur (Kwon et al., 2016). Un ARN de 60-70 nucléotides (nt) est ainsi libéré, et il présente une structure secondaire en épingle à cheveux (*hairpin*), nommée miARN précurseur (pre-miARN) (Lee et al., 2002; Zeng and Cullen, 2003). Le complexe DROSHA-DGCR8 clive les deux extrémités du brin du pri-miARN à la base de la structure en tige-boucle (Lee et al., 2003), et laisse apparaître chez le pre-miARN un phosphate en 5', et une extrémité libre simple brin en 3' de 1-4 nucléotides (Basyuk et al., 2003).

Il existe une autre voie de maturation des miARNs, celle des mirtrons, dont les gènes sont localisés dans les introns de gènes codants pour une protéine (O'Carroll and Schaefer, 2013; Ul Hussain, 2012). Les mirtrons sont maturés en pre-miARN à travers la machinerie d'épissage alternatif des ARNm, contournant ainsi l'action de DROSHA-DGCR8 (Babiarz et al., 2008; Yi et al., 2009). Alors que les mirtrons sont retrouvés

fréquemment chez la *Drosophila*, il en existe aujourd'hui peu de décrits chez les mammifères, ces derniers incluent miR-877, miR-702, miR-1124, miR-1141 (Berezikov et al., 2007), et plus récemment miR-1981 trouvé dans le cerveau de la souris (Babiarz et al., 2011).

Finalement, à la suite de cette première étape de maturation, le pre-miARN est activement transporté du noyau vers le cytoplasme par Exportine-5, un transporteur Ran-GTP (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003).

1.3.3.2. La deuxième étape de maturation : l'intervention de l'enzyme DICER.

La deuxième étape de maturation est prise en charge par l'enzyme DICER. Le pre-miARN est incorporé dans le complexe RLC (*RISC Loading Complex*), qui est composé de DICER, TRBP2 (*transactivation response element RNA-binding protein 2*), PACT (*PRKRA interferon-inducible dsRNA-dependent protein kinase activator A*) et d'une protéine AGO (Argonaute, aussi connue sous le nom de EIF2C). Le complexe RLC est responsable de la maturation du pre-miARN en miARN mature, de la sélection du brin mature, et de l'incorporation du brin mature dans une protéine AGO pour former le complexe RISC fonctionnel (*RNA-induced silencing complex*) (Jaskiewicz and Filipowicz, 2008). Pour cela, l'enzyme DICER élimine la boucle du pre-miARN, créant un duplex d'ARN long d'environ 21 nt, composé des miR-3p et -5p (Bartel, 2004; Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001). Ensuite, le duplex d'ARN est associé à une protéine de la famille Argonaute, puis déstabilisé par l'action d'une hélicase. Le brin passager (noté miARN*) est ensuite dégradé, alors que le brin mature, aussi appelé brin guide, est incorporé au complexe RISC (Kawamata and Tomari, 2010; Mourelatos et al., 2002). Le brin mature est recruté en fonction de la stabilité thermodynamique des deux extrémités du duplex (Hammond, 2005; Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Plus particulièrement, le brin qui possède l'extrémité 5' la plus instable est sélectionné comme étant le brin mature.

Lorsque le brin mature du miARN est associé au complexe RISC, cela forme le complexe miRISC, responsable du phénomène d'inhibition des gènes (*gene silencing*). Le miRISC consiste en l'assemblage d'un brin mature de miARN, d'une protéine de la famille Argonaute, de la protéine GW182 (*glycine-tryptophane GW repeat-containing protein of 182 kDa*), ainsi que d'autres protéines accessoires (U1 Hussain, 2012).

Chez les mammifères, la famille de protéines AGO se décompose en deux sous-classes: AGO et PIWI, et la sous-classe AGO contient 4 membres : AGO1 à 4 (Kim et al., 2009). Cette famille de protéines contient 3 domaines conservés dans l'évolution : PAZ, MID et PIWI, qui sont connus pour interagir avec les extrémités 5' et 3' du miARN (Jinek and Doudna, 2009; Peters and Meister, 2007) (Figure 4). Alors que toutes les protéines AGO présentent une activité RNase H chez l'ensemble des espèces, chez les mammifères, seule AGO2 en est dotée (Liu et al., 2004). Chez l'Homme, les miARNs peuvent interagir avec l'ensemble des protéines de la sous-classe AGO, ce qui suggère qu'elles ne doivent pas avoir de différences majeures (Ul-Hussain, 2012).

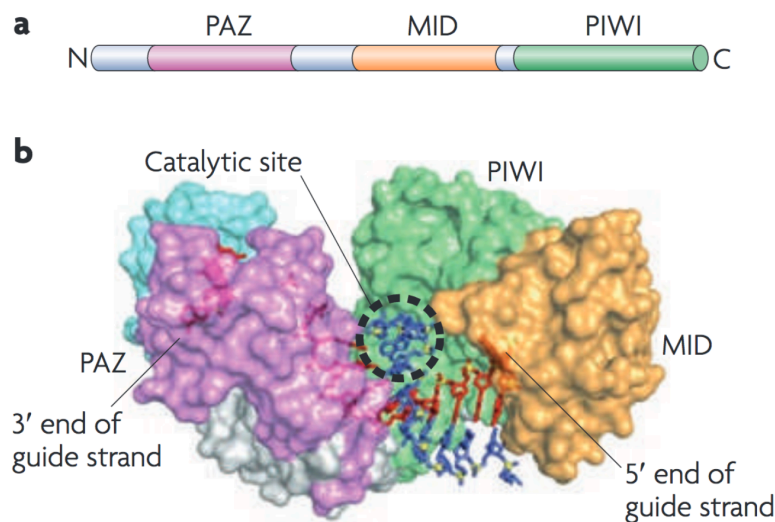


Figure 4: Présentation de la famille de protéines AGO.

A : Les 3 domaines caractéristiques des protéines de la famille AGO. Le domaine PAZ sert de domaine d'ancrage pour la partie 3' du petit ARN non codant, alors que le domaine MID sert de domaine d'ancrage pour la partie 5'. Le domaine PIWI peut exercer la fonction de RNase H. Chez les mammifères, cette fonction n'est présente que chez le membre AGO2. **B : Structure d'une protéine de la famille AGO.** Source : (Kim et al., 2009).

Une nouvelle voie de maturation non canonique, dépendante de l'enzyme DROSHA, mais indépendante de l'intervention de l'enzyme DICER a été mise en évidence (O'Carroll and Schaefer, 2013). Elle s'appuie sur l'activité d'endonucléase d'AGO2 mise en oeuvre lors de l'étape de clivage du pre-miARN (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010; Yang et al., 2010). En effet, chez les mammifères, AGO2 possède une forte activité endonucléotique de type RNase H, et favorise la réalisation de l'étape de maturation par l'enzyme DICER en clivant la partie 3' de certains pre-miARNs. Cette action crée un produit intermédiaire qui sert de substrat à l'enzyme DICER (Diederichs

and Haber, 2007). Ainsi, la contribution d'AGO2 dans les étapes de maturation des miARNs reste à explorer (O'Carroll and Schaefer, 2013).

1.4. La reconnaissance des ARNm cibles par les miARNs.

1.4.1. Les mécanismes de la reconnaissance.

1.4.1.1. La reconnaissance s'effectue par l'appariement de bases complémentaires.

La base de la reconnaissance se réalise par l'appariement de bases complémentaires entre le miARN et la cible (Bartel, 2009). Chez les plantes, cet appariement se réalise avec une complémentarité presque parfaite, alors qu'elle est imparfaite chez les métazoaires, et se détermine au minimum grâce à la région « *seed* » du miARN, qui correspond aux nucléotides 2 à 7 de l'extrémité 5' (Lewis et al., 2003). Les analyses bioinformatiques et expérimentales ont permis de déterminer quelques règles importantes qui interviennent dans la reconnaissance de la cible (Brennecke et al., 2005; Doench and Sharp, 2004; Grimson et al., 2007; Lewis et al., 2005; Nielsen et al., 2007) (Figure 5):

- La présence d'une complémentarité parfaite et continue de la région « *seed* » avec la séquence cible est la règle de base. Par ailleurs, il a été montré sur la séquence de la cible qu'une adénosine en position 1, ou qu'une adénosine ou une uracile en position 9, améliorent l'efficacité de la reconnaissance, bien que ces bases ne soient pas requises dans l'interaction avec le miARN (ces nucléotides sont représentés en jaunes sur la Figure 5).
- Une région de mésappariements peut être présente dans la région centrale du complexe miARN-ARNm, permettant la réalisation du clivage par la protéine Argonaute.
- Enfin, il doit exister une interaction complémentaire au niveau de la région 3' du miARN pour stabiliser l'interaction. Plus particulièrement, il doit exister une complémentarité entre les nucléotides 13 à 16 du miARN avec l'ARNm.

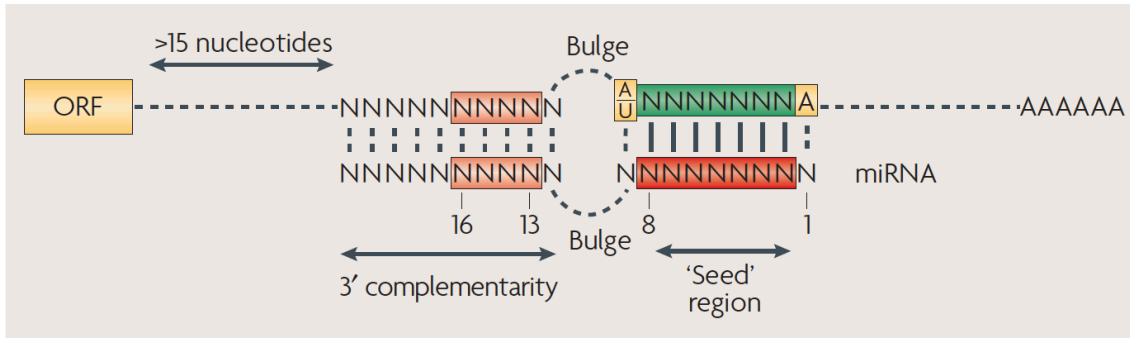


Figure 5: Représentation de l'appariement entre un miARN et son ARNm cible chez les métazoaires.

L'hybridation entre le miARN et l'ARNm cible s'effectue au niveau de la partie 3'UTR de l'ARNm. Elle présente une interaction parfaitement complémentaire avec la région « seed » du miARN, située entre les nucléotides 2 et 8. D'autres paramètres sont importants, comme une complémentarité entre la partie 3' du miARN et l'ARNm, ou encore la distance à laquelle se réalise l'interaction. Source : (Filipowicz et al., 2008).

D'autres facteurs sont importants pour améliorer l'efficacité de l'interaction, comme la présence d'une région voisine riche en adénosines et uraciles, et pour les longs 3'UTR, une position proche du codon stop, qui est souvent moins repliée et donc accessible (Gaidatzis et al., 2007; Grimson et al., 2007; Nielsen et al., 2007). Enfin, la présence de plusieurs sites d'hybridation sur l'ARNm cible favorise la répression effective de la cible. Lorsque les sites sont proches les uns des autres (10-40 nt), ils tendent à agir de façon coopérative (Brennecke et al., 2005; Doench and Sharp, 2004; Grimson et al., 2007; Lewis et al., 2005; Nielsen et al., 2007).

Quelques ciblage non canoniques via des mésappariements de la région « seed » ont été observés (Vidigal and Ventura, 2015). En particulier, il est montré qu'un mauvais appariement dans la région « seed » (Lal et al., 2009), ou bien un appariement de type G:U wobble (appariement bancal) maintiennent l'action régulatrice notable du miARN (Didiano and Hobert, 2006, 2008). Un appariement de type G:U wobble est un appariement non canonique entre deux nucléotides d'ARN qui ne suivent pas les règles d'appariement de type Watson-Crick (Varani and McClain, 2000). Cependant, bien que la possibilité d'un appariement non-canonique ait été vérifiée, la fonction de régulation n'a pas été confirmée (Agarwal et al., 2015).

1.4.1.2. Les miARNs reconnaissent principalement la partie 3'UTR des ARNm.

Communément, les miARNs s'hybrident au niveau de la partie 3'UTR des ARNm cibles (Lai, 2002; Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Cependant, quelques travaux

évoquent la possibilité que les miARNs peuvent également cibler les ARNm dans leur partie non codante 5', et même au niveau de la séquence codante (ORF pour *Open Reading Frame* en anglais).

Un travail réalisé chez le poisson zèbre montre que des constructions rapportrices exogènes voient leur expression réprimée suite à l'injection du miARN cible let-7, et ce quel que soit la position du site d'interaction : dans la partie 5' UTR, 3' UTR, ou dans la partie codante (Kloosterman et al., 2004). Une autre étude introduit le site d'interaction du miARN avec l'ARNm cible dans la partie 5' UTR de la construction rapportrice. Celle-ci contient également des sites IRES permettant de limiter l'interférence avec l'initiation de la traduction que peut provoquer la présence du complexe RISC dans la partie 5' UTR. Ce travail montre que dans la lignée cellulaire HeLa qui exprime de manière endogène le miARN cible let-7a, l'expression du gène rapporteur est inhibée (Lytle et al., 2007). Ces résultats proposent que l'association du complexe miRISC est mécaniquement possible sur l'ensemble des positions de l'ARNm et peut exercer sa fonction répressive.

D'autre part, des analyses computationnelles indiquent qu'un certain nombre d'ARNm ont la possibilité d'être ciblés dans les ORFs (Baek et al., 2008; Grimson et al., 2007; Lewis et al., 2005; Lim et al., 2005). Deux études viennent confirmer expérimentalement les prédictions bioinformatiques (Forman et al., 2008; Tay et al., 2008). Cependant, bien qu'elles soient plus fréquentes que celles réalisées en 5' UTR, elles restent moins fréquentes et moins efficaces que celles en 3'UTR (Bartel, 2009). L'une des raisons expliquant cette différence est que le complexe miRISC peut être déplacé par la machinerie de traduction (Bartel, 2004; Lytle et al., 2007). En conclusion, la démonstration expérimentale de la répression efficace d'un miARN par un ciblage au niveau de la partie 5' de l'ARNm ou dans les ORFs reste à ma connaissance encore peu documentée, cependant l'algorithme de prédiction miRanda (<https://omictools.com/miranda-tool>) prend en compte ce paramètre.

1.4.2. Le multi-ciblage.

Les prédictions bioinformatiques ont été les premières à envisager un multi-ciblage des ARNm par plusieurs miARNs (Krek et al., 2005; Lewis et al., 2005). A partir de plus de 100 miARNs préalablement caractérisés, il a été montré que chacun est capable de réguler une centaine d'ARNm cibles (Nilsen, 2007). De plus, partant du principe que la reconnaissance de l'ARNm cible est basée sur une complémentarité imparfaite entre les

séquences, et que la région 3' UTR est longue, plusieurs miARNs peuvent cibler un seul ARNm (Doench and Sharp, 2004) (Figure 6).

La première étude à démontrer expérimentalement qu'un même ARNm peut être régulé par plusieurs miARNs a été réalisée par Wu et ses collaborateurs (Wu et al., 2010). Ce travail démontre que 28 miARNs différents sont capables d'inhiber l'expression de CDKN1A, qui joue un rôle fondamental de suppresseur de tumeur dans les cancers.

Les estimations proposent que le nombre total de cibles concernées par la régulation par les miARNs approche le nombre total de gènes codants pour des protéines, ce qui confirme leur rôle de régulateur global de la cellule (Brennecke et al., 2005).

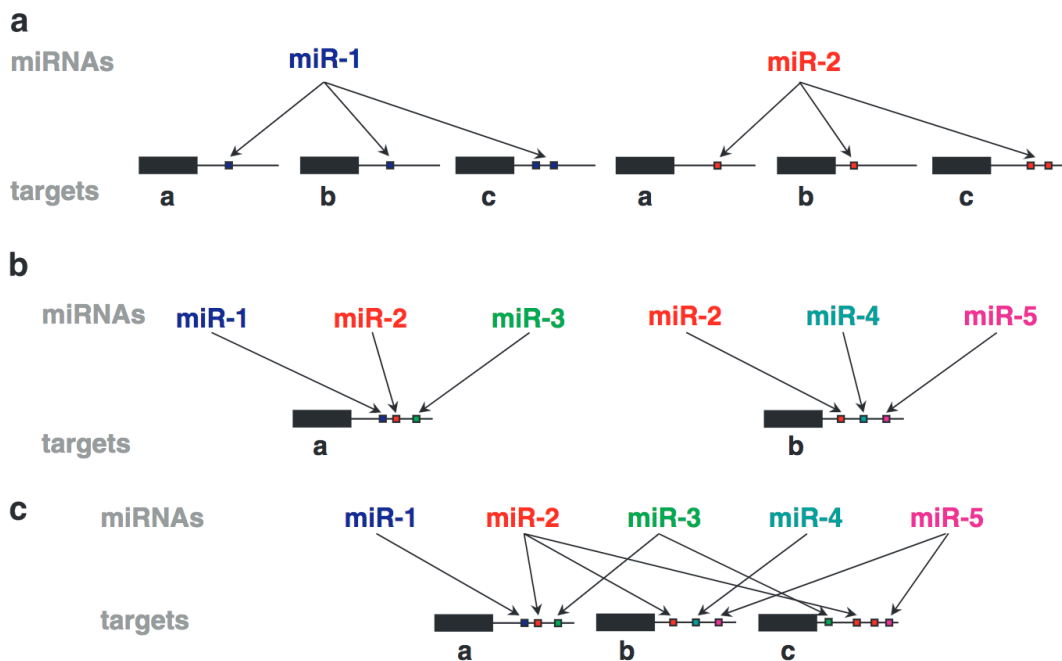


Figure 6: Multi-ciblage des ARNm par plusieurs miARNs.

A: Les miARNs sont capables de réguler plusieurs ARNm. Un même miARN peut cibler différents ARNm, dû à une reconnaissance basée sur une complémentarité imparfaite et une région 3'UTR longue. *B : Un ARNm peut être la cible de plusieurs miARNs.* La partie 3'UTR des ARNm est souvent longue, ainsi plusieurs sites de cibrages pour plusieurs miARNs différents peuvent être présents. *C : Représentation du réseau complexe de régulation entre les miARNs et les ARNm.* Source : (Peter, 2010).

1.5. La prédiction des ARNm cibles des miARNs

1.5.1. Les méthodes de prédiction des ARNm cibles des miARNs.

Les méthodes de prédiction des cibles de miARNs reposent sur les connaissances du mode d'interaction entre le miARN et l'ARNm. Ainsi, les cibles des miARNs se prédisent majoritairement en cherchant un appariement entre la séquence du miARN et la partie 3'UTR de l'ARNm (Lewis et al., 2003, 2005), et en particulier la précision de la prédiction s'améliore lorsque l'on se focalise sur une interaction entre la région « *seed* » du miARN et l'ARNm (Lewis et al., 2005). Aussi, la prise en compte du contexte tri-dimensionnel de la séquence 3'UTR affine les prédictions, et diminue le nombre de résultats faux-positifs (Grimson et al., 2007).

Par ailleurs, des modes d'interaction dits non-canoniques ont également été démontrés, dans lesquels se produisent des mésappariements ou des interactions de type G:U *wobble* au niveau de la séquence « *seed* », ou alors l'hybridation se réalise au niveau de la partie codante. L'ensemble de ces subtilités rend donc difficile le développement des algorithmes de prédiction.

1.5.2. Les algorithmes de prédiction des cibles.

Il existe de nombreuses interfaces disponibles et libres d'accès qui proposent l'accès à des algorithmes de prédiction des cibles des miARNs, parmi lesquelles les plus couramment utilisées par la communauté scientifique sont :

- **miRDB** (<http://www.mirdb.org/>) (Wang, 2008; Wong and Wang, 2015). L'algorithme de prédiction utilisé est miRTarget (Wang and El Naqa, 2008) et permet d'identifier des cibles avec des interactions canoniques et non canoniques. Les recherches prédictives sont réalisables dans 5 organismes différents : l'Homme, le chien, la souris, le rat et le poulet. De manière intéressante, les recherches peuvent s'effectuer à partir de la séquence nucléotidique du miARN, ce qui permet de prédire les cibles de nouveaux miARNs non référencés. Enfin, il existe une interface wiki qui permet à la communauté d'ajouter les résultats des travaux aisément.
- **TargetScan** (http://www.targetscan.org/vert_71/). Cet algorithme de prédiction est jusqu'à présent le plus utilisé, et considéré comme celui de

référence, pour les miARNs connus. Les prédictions des cibles se réalisent principalement en prenant en compte les caractéristiques canoniques d'interaction, ainsi que la conservation entre les espèces. Toutefois les algorithmes ont été améliorés et s'attachent à considérer aussi le nombre de sites d'interaction sur le 3'UTR, la stabilité thermodynamique d'hybridation, l'identité des nucléotides aux positions 1 et 8 du miARN, ou encore la conservation entre les espèces (Agarwal et al., 2015). L'analyse de l'ensemble de ces caractéristiques donne un score de probabilité d'interaction. Les recherches peuvent se réaliser contre 10 espèces différentes, et s'effectuent en entrant le nom du miARN d'intérêt. Ainsi, seuls les miARNs déjà découverts peuvent être analysés.

- **microRNA.org** (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). Cette interface permet à la fois de prédire les cibles des miARNs, et d'évaluer le profil d'expression des miARNs dans différents tissus (Betel et al., 2008). La prédiction se réalise grâce à l'algorithme miRanda (Enright et al., 2003; John et al., 2004), qui s'intéresse à la fois aux interactions canoniques et non-canoniques. Un score de probabilité est incorporé aux résultats des prédictions. L'interface propose l'utilisation de son algorithme dans 5 organismes : l'Homme, la souris, le rat, la drosophile et le nématode.
- **DIANA-microT** (<http://diana.imis.athenainnovation.gr>). La plateforme propose différents outils qui s'articulent autour de la compréhension du mode de régulation des miARNs : la prédiction de leurs cibles, l'accès aux travaux de validation d'interaction entre un miARN et son ARNm cible, ou encore l'analyse de voies de signalisation ciblées par les miARNs (Paraskevopoulou et al., 2013). L'algorithme de prédiction utilisé est DIANA-microT-CDS, le seul accessible en ligne qui permette de prédire des cibles à la fois dans la partie 3'UTR et dans la région codante de l'ARNm (Reczko et al., 2012).

Très récemment, une nouvelle base de données a été développée, et propose des fonctionnalités originales et innovantes : CSmiRTar (Wu et al., 2017). Elle a collecté de manière computationnelle les cibles prédites pour les miARNs de l'Homme et de la souris

à partir des 4 bases de données décrites précédemment, puis a implémenté des filtres qui permettent de chercher:

- Des cibles de miARNs exprimées spécifiquement dans un tissu, ou bien qui se rapportent à une pathologie précise ;
- L'ensemble des multiples cibles communes à un miARN, dans un tissu spécifique ou dans le cadre d'une pathologie ;
- Les miARNs impliqués dans une pathologie d'intérêt.

Cet outil propose de nouvelles perspectives d'analyse et de compréhension de l'impact de la régulation des fonctions cellulaires réalisée par les miARNs.

L'avancée de la compréhension des modes de fonctionnement des miARNs entraîne un perfectionnement des algorithmes déjà existants et un développement de manière continue (Reyes-Herrera and Ficarra, 2012).

1.6. Les modes d'action des miRNAs.

Le rôle principal imputé aux miARNs est **l'inhibition de la synthèse protéique** via la **régulation de la traduction des ARNm** suite à son hybridation sur la partie 3'UTR (Bartel, 2004; Basak et al., 2016; Oliveto et al., 2017) (Figure 7). Dans certains cas particuliers, les miARNs peuvent également être des activateurs de la traduction, et cette fonction, encore peu décrite, est considérée comme étant non-canonique (Vasudevan, 2012).

Chez les mammifères, les miARNs sont considérés comme pouvant réguler l'expression de 60% des gènes (Friedman et al., 2009). La régulation endogène médiée par les miARNs inhibe l'expression de la cible à hauteur de 20 à 30% (Baek et al., 2008; Hobert, 2007).

1.6.1. Les miARNs, des inhibiteurs de la traduction des ARNm.

Les miARNs sont des acteurs majeurs de l'inhibition de l'expression des gènes en agissant par deux mécanismes principaux (Bartel, 2004):

- par le **clivage** de l'ARNm cible,

- par la **répression de la traduction** de l'ARNm cible.

Le choix du mécanisme semble orienté par le degré de la complémentarité entre le miARN et l'ARNm cible : si la complémentarité est forte, le clivage de l'ARNm prévaut, alors qu'en cas de complémentarité imparfaite, il y aura plutôt une répression de la traduction (Doench et al., 2003; Hutvagner and Zamore, 2002; Zeng et al., 2002, 2003). Aussi, il a été remarqué une différence de degré de complémentarité entre les miARNs et les ARNm cibles entre les plantes et les animaux. En effet, celui-ci est élevé chez les plantes, privilégiant alors le clivage de l'ARNm, alors que chez les métazoaires la complémentarité est faible, favorisant alors le mécanisme d'inhibition de la répression de la traduction (Rhoades et al., 2002). Cependant, il doit exister au minimum une stricte complémentarité des nucléotides 2 à 7 des miARNs, qui représentent la région « *seed* » (voir Chapitre 1, paragraphe 1.4.1.1).

D'autres mécanismes ont également été rapportés, comme la dégradation, la déadénylation et la séquestration de l'ARNm. La communauté scientifique ne sait toujours pas comment, et si, ces mécanismes sont interconnectés entre eux (Nilsen, 2007) (Figure 7).

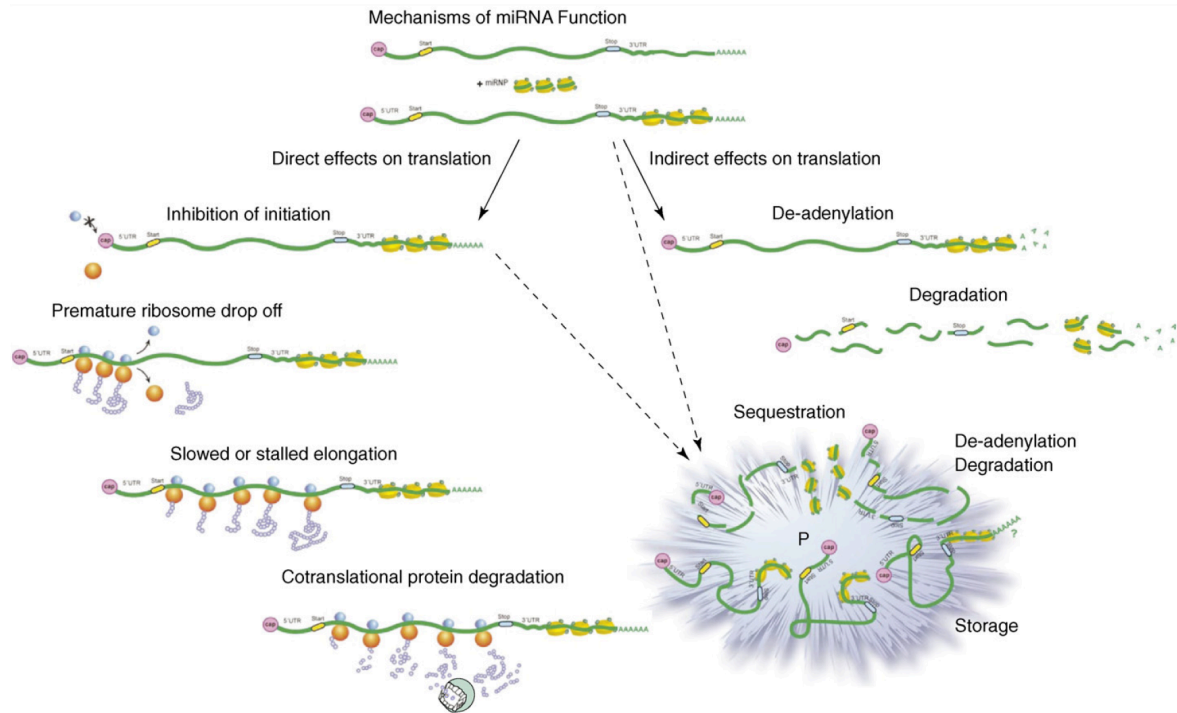


Figure 7: Les principaux mécanismes de répression de la traduction des ARNm médiés par les miARNs chez les animaux.

Il existe divers moyens de régulation des ARNm par les miARNs, qui peuvent se diviser en deux grandes catégories : **1)** un effet direct sur la traduction, ou **2)** un effet indirect sur la traduction. Source : (Nilsen, 2007).

1.6.1.1. Clivage de l'ARNm.

Lors du clivage de l'ARNm par AGO, celui-ci se déroule entre les nucléotides 10 et 11 du miARN (Elbashir et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002; Kasschau et al., 2003; Llave et al., 2002). Ce mode d'action ne change pas lors d'une complémentarité imparfaite entre la partie 5' du miARN et l'ARNm (Kasschau et al., 2003; Palatnik et al., 2003), suggérant que le site de clivage semble déterminé par la nature des bases du miARN. A la suite du clivage de l'ARNm, le miARN reste intact et peut conduire à la reconnaissance et à la destruction d'autres ARNm (Hutvagner and Zamore, 2002; Tang et al., 2003).

1.6.1.2. Inhibition de la traduction de l'ARNm.

L'action de régulation des miARNs impacte la synthèse protéique et en diminue le niveau d'expression. En revanche, l'action des miARNs sur le niveau d'expression de l'ARNm cible est controversé : certaines études montrent que celui est diminué (Boutz et

al., 2007; O'Donnell et al., 2005), alors que d'autres montrent qu'il reste inchangé (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002).

La traduction des ARNm se réalise en 4 étapes principales : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage. L'inhibition de la traduction de l'ARNm par les miARNs peut s'effectuer au niveau de 3 étapes clés (Filipowicz et al., 2008):

- Lors de l'initiation,
- Juste après l'initiation,
- Pendant l'élongation.

Inhibition de l'initiation de la traduction de l'ARNm.

Certains résultats sont en faveur d'un mode d'action via la répression au niveau de l'initiation de la traduction de l'ARNm. En effet, les ARNm réprimés sont trouvés en haut des gradients de sédimentation (Huang et al., 2007; Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005), ce qui indique une diminution de l'incorporation des ribosomes dans l'ARNm. Par ailleurs, les ARNm qui possèdent une séquence IRES (*internal ribosome entry site*) ou une coiffe non fonctionnelle ne sont pas inhibés efficacement par les miARNs, ce qui suggère que ces derniers agissent dans les premiers stades de l'initiation, et impliquent possiblement la reconnaissance de la coiffe (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005).

Des études qui se sont intéressées à caractériser des extraits cellulaires issus de réticulocytes de lapin, d'embryons de Drosophile, d'ascites de souris et de la lignée cellulaire humaine HEK 293, montrent que la présence de la coiffe est requise pour la répression de l'ARNm (Mathonnet et al., 2007; Thermann and Hentze, 2007; Wakiyama et al., 2007; Wang et al., 2006), et que la queue polyadénylée joue également un rôle essentiel dans le processus (Wakiyama et al., 2007; Wang et al., 2006). En particulier, il a été montré que les miARNs inhibent l'association de l'ARNm cible avec la petite sous-unité du ribosome (Thermann and Hentze, 2007), ou bien réduit la quantité du complexe d'initiation 80S (Mathonnet et al., 2007).

D'autres travaux supportent l'hypothèse d'une inhibition de l'initiation de la traduction des ARNm. En effet, il a été démontré chez l'Homme que AGO2 est capable de se lier à la coiffe (m7G-cap) des ARNm, via un motif qui ressemble à la séquence d'interaction entre la coiffe et le facteur d'initiation de la traduction eIF4E. Cette étude propose qu'AGO2 entre en compétition avec la liaison de la protéine eIF4E sur la coiffe,

qui est un facteur important dans le recrutement de la petite sous-unité du ribosome (Kiriakidou et al., 2007).

Un mécanisme alternatif de tous ceux déjà décrits démontre l'association d'AGO2 avec eIF6 et la grande sous-unité du ribosome 60S (Chendrimada et al., 2007). Le facteur eIF6 est connu pour être une protéine qui prévient la formation du ribosome 80S en se liant à la large sous-unité 60S, l'empêchant de s'associer à la petite sous-unité. Ainsi, le recrutement de eIF6 par AGO2 pourrait empêcher l'association des petites et grandes sous-unités du ribosome et donc inhiber la traduction de l'ARNm (Chendrimada et al., 2007).

Mécanismes d'inhibition après l'initiation de la traduction.

Les miARNs et leurs cibles sont associés avec les polyribosomes (Nottrott et al., 2006; Olsen and Ambros, 1999; Petersen et al., 2006), et la répression se produit même lorsque la traduction est initiée dans les sites IRES (Lytle et al., 2007; Petersen et al., 2006). Ces observations laissent penser que les miARNs peuvent boquer la traduction après l'étape d'initiation.

Par exemple, une étude propose que les miARNs recrutent des protéases vers les polysomes en cours de traduction, et ainsi promeuvent la dégradation des polypeptides naissants (Nottrott et al., 2006). Cette possibilité est soutenue par l'incapacité d'immunoprécipiter l'ARNm réprimé avec des anticorps dirigés contre le polypeptide en croissance (Chekulaeva and Filipowicz, 2009).

Il a également été montré que les miARNs seraient capables de promouvoir une terminaison de la traduction de manière précoce et le décrochage des ribosomes (Petersen et al., 2006).

Dé-adénylation et dégradation de l'ARNm.

Alors que de nombreuses études démontrent que les miARNs répriment la traduction sans moduler le niveau de l'ARNm (Brennecke et al., 2003; Doench and Sharp, 2004; Pillai et al., 2005; Zeng et al., 2003), d'autres démontrent au contraire que le niveau de l'ARNm est largement diminué (Bagga et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Yekta et al., 2004).

Le cas de figure d'un clivage endonucléolytique de l'ARNm est prépondérant chez les plantes, mais rare chez les animaux. Cependant, deux études montrent que les miARNs peuvent aussi cliver l'ARNm chez les mammifères. Par exemple, le miR-196 a été montré comme étant parfaitement complémentaire sur toute sa longueur à la partie 3'UTR de l'ARNm HoxB8. Cette complémentarité entraîne un clivage de l'ARNm de HoxB8 (Hornstein et al., 2005; Yekta et al., 2004).

La dégradation de l'ARNm peut également être induite par des mécanismes qui entraînent en premier lieu sa déstabilisation (Leung et al., 2006). La déstabilisation de l'ARNm est médiée par la dé-adénylation suivie de l'enlèvement de la coiffe de l'ARNm. En effet, quatre études différentes, réalisées dans l'embryon du poisson zèbre, des cellules humaines et chez la drosophile, montrent l'existence d'un mécanisme de dé-adénylation dépendant des miARNs (Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Mishima et al., 2006; Wu et al., 2006). La dé-adénylation de l'ARNm, et par conséquent la perte des protéines qui se lient à la queue poly(A), entraînent la perte de la coiffe, ce qui expose l'ARNm aux enzymes de digestions exonucléotidiques via l'extrémité 5' (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2007a).

La séquestration des ARNm dans les Processing-bodies.

La séquestration des ARNm dans une structure peut permettre de contrôler l'accès de la machinerie de traduction, et de concentrer un ensemble de facteurs qui les régulent. Il a été montré que les ARNm dont la traduction est réprimée et le complexe RISC sont trouvés accumulés dans deux sous-structures cellulaires : les *Processing-bodies* (*P-bodies*) et les granules de stress (Krol et al., 2010a). Nous ne nous intéresserons qu'aux *P-bodies*, qui sont ubiquitaires, alors que comme son nom l'indique, les structures de stress n'apparaissent qu'en cas de stress cellulaire, une condition qui n'est pas abordée dans ce travail de thèse.

Les *P-bodies*, aussi appelés *GW bodies*, sont un regroupement de plusieurs molécules dans le cytoplasme de la cellule, non délimité par une membrane. Ils contiennent une variété d'enzymes impliquées dans le *turnover* des ARNm, incluant des enzymes de décoiffage, des dé-adénylases ainsi que des exonucléases (Eulalio et al., 2007b; Valencia-Sanchez et al., 2006). Dans les cellules animales, ils contiennent également la protéine GW182 (Eystathioy et al., 2002, 2003). De manière plus intéressante, plusieurs travaux montrent que les protéines Argonautes sont également présentes dans les *P-bodies*, ainsi que d'autres protéines qui interagissent avec les miARNs (Eulalio et al., 2007b). Ce sont des

structures dynamiquement dans lesquelles les ARNm et les protéines entrent et sortent en continu (Franks and Lykke-Andersen, 2008; Parker and Sheth, 2007), et leur nombre et taille varient en fonction de l'activité de traduction de la cellule (Yang et al., 2004). Tous ces éléments laissent penser que les *P-bodies* interviennent à la fois dans le stockage et la dégradation des ARNm non traduits (Krol et al., 2010a).

Suite à ces découvertes, un modèle attractif du mécanisme d'action des miARNs a été proposé (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2007b; Valencia-Sanchez et al., 2006). Un miARN lié à une protéine Argonaute reconnaît son ARNm cible via un mécanisme d'hybridation de type Watson-Crick. La protéine Argonaute interagit avec GW182, qui délivre l'ensemble du complexe miARN-ARNm dans le *P-body*. En ce lieu, l'ARNm est dé-adénylé, puis soit décoiffé et dégradé, ou alors simplement retenu. Dans les *P-bodies*, l'absence de ribosomes empêche la traduction des ARNm. L'hypothèse de la rétention de l'ARNm est étayée par un exemple dans lequel un ARNm est tenu à l'écart des ribosomes dans les *P-bodies* chez la levure (Bregues et al., 2005), et ce phénomène est dépendant des miARNs chez les mammifères (Bhattacharyya et al., 2006).

Bien que ce modèle soit cohérent avec les éléments de la littérature, et attractif, d'autres observations y sont cependant incompatibles. En particulier, des résultats de microscopie électronique montrent que moins de 2% des protéines Argonautes sont localisées dans les *P-bodies* (Leung et al., 2006). Par ailleurs, comme nous l'avons déjà évoqué, plusieurs études montrent que les miARNs sont associés avec les polysomes (Kim et al., 2004; Nottrott et al., 2006), voire même qu'ils peuvent être associés aux ARNm pendant les phénomènes de traduction (Maroney et al., 2006). Finalement, des expériences de sous-expression de composants du *P-body* ne compromettent pas la régulation effectuée par les miARNs (Chu and Rana, 2006). Une étude suggère même que les *P-bodies* ne sont pas la cause, mais la conséquence de la réalisation des mécanismes d'inhibition des gènes (Eulalio et al., 2007c).

1.6.2. Les miARNs peuvent être des activateurs de la traduction des ARNm.

Récemment, l'action des miARNs comme activateurs de la traduction a été suggérée, mais reste un phénomène rare (Iwasaki and Tomari, 2009; Ørom et al., 2008; Roberts et al., 2011; Tsai et al., 2009). Pour donner un exemple, en condition de pénurie en sérum dans le milieu de culture de la lignée HEK 293, il a été démontré que le miR-369-3p recrute un complexe miRISC particulier composé d'AGO2, et d'un isoforme spécifique de

FXR1 (*Fragile X mental retardation-related protein 1*), qui est FXR1-iso-a. Ce complexe active la traduction de l'ARNm *Tnfa*, en s'hybridant au niveau d'une région riche en adénosines et uraciles. Cette action entraîne un arrêt du cycle cellulaire des cellules, qui peut s'expliquer comme étant un mécanisme de protection et de survie des cellules face à la pénurie de sérum (Vasudevan and Steitz, 2007; Vasudevan et al., 2007).

Une autre étude propose que l'interaction du miR-10a avec la partie 3'UTR de plusieurs ARNm qui codent pour des protéines ribosomales résulte en l'augmentation de leur traduction en réponse à un stress cellulaire ou à une pénurie de nutriments (Ørom et al., 2008). Par ailleurs, il a aussi été montré que le miR-122, spécifiquement exprimé dans le foie, stimule la traduction de l'ARN HCV, qui est l'ARN du virus de l'hépatite C. Cela serait expliqué par une augmentation de l'incorporation des ribosomes dans les séquences IRES (Henke et al., 2008).

1.6.3. Comment expliquer tous ces mécanismes différents ?

L'ensemble de ces résultats conflictuels est difficile à concilier, et la compréhension du mode de régulation des miARNs semble être le sujet le plus divergent au sein de la communauté (Eulalio et al., 2008; Wu and Belasco, 2008). Toutefois, l'hypothèse de leur co-existence n'est pas à écarter. Les divergences peuvent provenir de la diversité des modèles biologiques, ainsi que des différentes méthodologies employées.

Concernant les biais qui peuvent être introduits en fonction de la méthode utilisée, il a été rapporté que la nature du promoteur qui contrôle l'expression du gène rapporteur est importante (Kong et al., 2008). L'ARNm rapporteur exprimé sous le promoteur SV40 montre une association moindre avec les polysomes lorsqu'il est réprimé par les miARNs, alors que cette dernière ne change pas lorsqu'il est exprimé sous le promoteur TK. Cette étude laisse penser que les événements moléculaires qui se sont déroulés dans le noyau déterminent le mode de répression dans le cytoplasme.

Il a aussi été montré que les systèmes rapporteurs *in vitro* couramment utilisés ne sont pas toujours très robustes, et que peut-être que l'inhibition observée à travers leur expression serait inférieure à celle attendue *in vivo* (Chekulaeva and Filipowicz, 2009; Humphreys et al., 2005).

La nature du rapporteur utilisé est aussi importante. En effet, certaines études utilisent des rapporteurs artificiels qui contiennent de multiples sites de liaison avec le miARN, qui peuvent ne pas traduire parfaitement la réalité (Eulalio et al., 2008; Humphreys et al., 2005; Wakiyama et al., 2007).

La méthode de transfection peut également jouer un rôle important comme le témoigne l'étude de Lytle et de ses collaborateurs (Lytle et al., 2007). Réaliser une transfection avec soit des lipides cationiques, soit une électroporation, amène à des résultats divergents. Cela peut venir du fait que l'ARN électroporé peut préférentiellement rester dans le cytoplasme, alors que la transcription dans le noyau de l'ADN et l'export dans le cytoplasme est un mécanisme plus long qui peut retarder la fenêtre d'action du miARN. Par ailleurs, les méthodes de transfection par des lipides cationiques peut s'avérer plus efficace que l'électroporation (Felgner and Ringold, 1989). Il se peut donc que l'expression de l'ADN exogène produise une quantité d'ARN qui dépasse la capacité de régulation par les miARNs.

Une autre explication peut venir de l'environnement de l'ARNm lui-même. En effet, il existe différentes études qui décrivent que le contexte de l'ARNm détermine le mécanisme de répression. Par exemple, ce travail (Behm-Ansmant et al., 2006) étudie la réponse de différents 3'UTR après la régulation des miARNs. Les niveaux de répression sont les mêmes, en revanche les mécanismes qui induisent la répression diffèrent : le premier ARNm est réprimé au niveau de la traduction, et son niveau d'expression est stable ; le second est déstabilisé, et le dernier est réprimé à la fois par la déstabilisation de l'ARNm et par l'inhibition de la traduction. L'interprétation des auteurs est que chaque 3'UTR propose un environnement unique, car ils interagissent avec différentes protéines, ne proposent pas les mêmes repliements, et ne recrutent pas forcément les mêmes machineries RISC pour lesquelles il existe 4 protéines AGO différentes.

Enfin, la stœchiométrie entre les miARNs et les ARNm est un facteur déterminant qui peut impacter le mode de régulation. La coopération entre les sites d'hybridation du miARN sur l'ARNm cible est aussi importante. Cependant, les techniques actuelles ne sont pas assez précises pour s'intéresser à ces questions.

1.7. Comment réguler ces régulateurs ?

L'expression des miARNs est soumise à une régulation fine, qui peut s'effectuer lors de toutes les étapes de leur biogénèse, mais aussi lorsqu'ils sont matures. Plusieurs revues sont consacrées à ce sujet : (Davis-Dusenbery and Hata, 2010; Krol et al., 2010a; Towler et al., 2015; Tran and Hutvagner, 2013).

Les principaux mécanismes de régulation seront évoqués assez brièvement, en revanche une partie sera consacrée plus en détail à la régulation de l'expression des miARNs dans le système nerveux central, le modèle d'étude de ce travail de thèse (voir Chapitre 1, paragraphe 1.9.3).

1.7.1. Régulation de la transcription des miARNs.

Des études montrent que les caractéristiques des promoteurs des miARNs sont très similaires à celles des gènes codants pour des protéines : ils possèdent une haute fréquence d'îlots CpG, des boîtes TATA, des séquences de reconnaissance avec TFIIB, des éléments d'initiation et des éléments propices aux modifications des histones. Cela implique que la transcription des gènes de miARNs peut être régulée dynamiquement en réponse à des facteurs de croissance par exemple. Il a ainsi été montré que C-MYC d'une part est capable d'activer la transcription du cluster miR-17-92 (O'Donnell et al., 2005), et d'autre part qu'il diminue l'expression de nombreux miARNs connus comme étant des suppresseurs de tumeur : miR-15a, -29, -34 et la famille let-7 (Chang et al., 2008).

Des mécanismes épigénétiques peuvent aussi intervenir dans la régulation de la transcription des gènes de miARNs :

- l'hyperméthylation du promoteur du miARN peut contribuer à réduire son expression, en particulier dans les cancers (Lujambio and Esteller, 2009; Lujambio et al., 2008; Saito et al., 2006) ;
- la modification des histones joue également un rôle dans la régulation de la transcription des miARNs en contexte cancéreux (Scott et al., 2006).

Ainsi, tout comme les gènes codants pour des protéines, la transcription des gènes de miARNs est finement régulée.

1.7.2. Régulation de la première étape de maturation : le microprocesseur Drosha/DGCR8.

La régulation de l'expression des miARNs peut être modulée via le microprocesseur DROSHA/DGCR8.

Tout d'abord, les protéines DROSHA et DGCR8 s'autorégulent entre elles. En effet, DGCR8 stabilise l'expression de DROSHA à travers une interaction avec son domaine central, et DROSHA contrôle le niveau de DGCR8 en clivant la structure en épingle à cheveux présente dans l'ARNm de DGCR8, inhibant ainsi son expression (Han et al., 2009; Kadener et al., 2009; Triboulet et al., 2009). Le ratio d'expression de ces deux protéines est important pour la biogénèse des miARNs, car une surexpression à un niveau 3 fois supérieur au niveau basal de DGCR8 inhibe largement l'activité de Drosha *in vitro* (Gregory et al., 2004). Enfin, de façon intéressante, la liaison d'un hème à DGCR8 favorise sa dimérisation et facilite l'activité de maturation des pri-miARN par DROSHA (Faller et al., 2007).

Par ailleurs, le niveau d'expression de DROSHA est montré comme étant régulé dans des cas de pathologies. Par exemple, il est augmenté dans les stades terminaux du cancer du col de l'utérus (Muralidhar et al., 2007; Sugito et al., 2006).

L'efficacité de l'activité du complexe peut aussi être affectée. Les cellules qui croissent en condition de confluence montrent un niveau plus important en pre-miARN et miARN matures, alors que les niveaux protéiques de DROSHA et DGCR8 restent inchangés (Hwang et al., 2009). De plus, les extraits de ces cellules permettent une conversion plus efficace du pri-miARN et pre-miARN dans des essais *in vitro*. Le mécanisme reste inconnu, mais des modifications post-transcriptionnelles ou l'association à des cofacteurs sont susceptibles d'expliquer le phénomène (Hwang et al., 2009).

1.7.3. Régulation de l'export dans le cytoplasme.

Une étude propose que l'étape d'export du pre-miARN dans le cytoplasme peut contribuer à la régulation de l'expression des miARNs. Les pre-miARN-105, -128 et -31 sont déterminés dans beaucoup de types cellulaires différents comme étant hautement exprimés. Cependant, sous certaines conditions, la présence de ces miARNs matures n'est pas détectable, et les expériences d'hybridation *in situ* montrent une accumulation des pre-

miARNs dans les nucléoles du noyau (Lee et al., 2008). Le mécanisme d'action reste cependant toujours méconnu.

1.7.4. Régulation de la deuxième étape de maturation : DICER et AGO.

1.7.4.1. La modulation de DICER.

Le niveau d'expression de l'enzyme DICER est modulé dans plusieurs cancers, à la hausse ou à la baisse, et semble être corrélé avec un pronostic défavorable pour le patient (Chiosea et al., 2006; Karube et al., 2005). Par ailleurs, la déplétion des co-facteurs de DICER : TRBP et PACT, entraîne une diminution du niveau d'expression de la protéine DICER (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006). A l'inverse, la voie de signalisation MAPK/ERK permet la phosphorylation de TRBP, qui, à l'état phosphorylé, favorise la production des miARNs en augmentant la stabilité de DICER (Paroo et al., 2009).

Le niveau de régulation peut également s'effectuer sur l'efficacité de DICER. Contrairement à l'enzyme DROSHA, l'enzyme DICER est extrêmement efficace de base (Lau et al., 2001; Lee et al., 2008). Ainsi, les étapes de régulation vont principalement concerner son inhibition. Par exemple les miR-143 et -145 matures sont sous-exprimés dans les tissus cancéreux de colon, alors que l'expression des pre-miARNs ne diffère pas. Ceci suggère que l'étape de maturation par DICER est inhibée dans la tumeur colorectale (Michael et al., 2003).

1.7.4.2. Le contrôle des protéines AGO.

Il existe 4 types de protéines AGO chez l'Homme, qui sont toutes capables de se lier aux miARNs. En revanche, AGO2 est la seule protéine qui possède une activité de clivage de l'ARN (Hutvagner and Simard, 2008). Il a été montré que l'expression ectopique des protéines AGO résulte en une augmentation drastique en miARNs matures (Diederichs and Haber, 2007), et que au contraire, la délétion d'AGO2 dans les cellules MEFs (*mouse embryonic fibroblastes*) et les cellules hématopoïétiques provoque une réduction massive des miARNs matures étudiés (Diederichs and Haber, 2007; O'Carroll et al., 2007). Enfin, dans les cancers, le niveau d'expression de la protéine AGO2 est souvent montré comme étant dérégulé comparé à la condition saine, aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine (Kim et al., 2010; Rybak et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le niveau d'expression des protéines AGO influence la quantité de miARNs matures dans la cellule.

1.7.5. Régulation des miARNs matures.

Les mécanismes de régulation de l'expression des miARNs via la modulation du niveau du miARN mature ont été moins étudiés, en particulier car les miARNs étaient considérés comme des molécules stables, dont la présence était détectée plusieurs heures et même jours après l'arrêt de leur production (Baccarini et al., 2011; Gantier et al., 2011; Lee et al., 2003). En effet, une étude dans laquelle l'enzyme DICER a été délétée dans des fibroblastes embryonnaires de souris estime le temps de demi-vie moyen des miARNs de 119h, soit 10 fois supérieur à celui des ARNm (Gantier et al., 2011). Quelques revues énumèrent les travaux à ce sujet : (Rüegger and Großhans, 2012; Towler et al., 2015).

1.7.5.1. La stabilité et l'efficacité d'action des miARNs.

La stabilité des miARNs matures peut être affectée par le cycle cellulaire (Avraham et al., 2010; Hwang et al., 2007; Rissland et al., 2011). Le premier exemple à le montrer concerne le miR-29b dans les cellules HeLa (issues de la patiente Henrietta Lacks). Des expériences similaires à du « *pulse-chase* » révèlent par exemple que le temps de demi-vie de miR-29b est de 4h dans les cellules en division, alors qu'il est de plus de 12h dans les cellules en interphase (Hwang et al., 2007). De plus, cette étude révèle que le miR-29b s'accumule dans le noyau comparé au cytoplasme, grâce à la présence d'un motif de localisation nucléaire dans sa séquence. Ces résultats laissent penser que ce miARN a pour fonction de réguler la transcription ou l'épissage de ces cibles, par un mécanisme pas encore élucidé (Hwang et al., 2007).

Aussi, la stabilité peut être affectée par des enzymes qui dégradent les miARNs. Dans des cellules de mélanome humaines, il a été montré que PNPT1, une 3'-5' exoribonucléase, dégrade certains miARNs matures sans affecter les niveaux d'expression des pri- et pre-miARNs (Das et al., 2010). En particulier les miARNs miR-221 et -222 sont affectés, et leur dégradation est accompagnée de l'augmentation du niveau d'expression de p27^{kip1}, une de leurs cibles confirmées (Galardi et al., 2007).

Un autre mécanisme influence largement la stabilité et l'efficacité d'action des miARNs : la modification de la séquence mature du miARN. Plusieurs études montrent que l'adénylation (Burroughs et al., 2010; Katoh et al., 2009) et l'uridylation (Mullen and Marzluff, 2008) de l'extrémité 3' du miARN sont capables de moduler à la fois la stabilité et l'efficacité du miARN.

Enfin, une étude récente démontre que l'hybridation aléatoire des miARNs sur une cible non-canonique, c'est-à-dire dépourvue de l'interaction avec la région « *seed* », entraîne une déstabilisation du miARN, qui se libère de la protéine AGO et donc du complexe RISC. Ce mécanisme est suggéré comme pouvant permettre le recyclage des miARNs qui ont leurs cibles peu représentées dans la cellule, et ainsi l'incorporation de nouveaux miARNs par la protéine AGO (Park and Shin, 2017). En d'autres termes, cela favoriserait le recyclage des complexes RISC, en leur permettant d'incorporer régulièrement des miARNs dont leurs cibles sont effectivement exprimées dans la cellule.

1.7.5.2. Séquestration et l'élimination des miARNs.

Quelques travaux suggèrent que les corps multivésiculaires (MVBs), qui sont des structures issues des endosomes tardifs, sont impliqués dans la régulation des miARNs (Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009). Les MVBs accumulent dans leur lumière des vésicules qui peuvent être soit délivrées au lysosome pour de la dégradation, soit libérées dans le milieu extracellulaire en tant qu'exosomes et participer à de la communication intercellulaire (ce sujet sera largement abordé dans le chapitre 3), ou à de l'élimination. En effet, il est montré que bloquer la voie de biogénèse des MVBs influence le niveau de régulation par les miARNs. Plus particulièrement, bloquer le complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), très important pour la biogénèse des vésicules intraluminales localisées dans la lumière du MVB, contribue à inhiber la répression due aux miARNs. Au contraire, le renouvellement des MVBs via HSP4 stimule l'activité des miARNs. Aussi, la déplétion de certains composants du complexe ESCRT amène à une augmentation en niveau de protéine GW180 (Gibbings et al., 2009), couplé à un assemblage perturbé du complexe RISC avec les petits ARNs (Lee et al., 2009). Ces résultats suggèrent que le MVB peut jouer un rôle important dans la formation et le recyclage des complexes miRISC (Krol et al., 2010a).

1.8. La nomenclature des miARNs.

Le nom des miARNs est assigné par un organisme indépendant : *The microRNA Registry* (Griffiths-Jones, 2004, 2010). Le nom d'un nouveau miARN est assigné uniquement après l'acceptation du travail par un journal, les auteurs étant autorisés à utiliser un nom temporaire dans les phases de soumission et de révision du travail.

La nomenclature des miARNs a beaucoup évolué depuis leur découverte, et s'établit actuellement selon les règles suivantes (Desvignes et al., 2015) :

- Le précurseur est nommé avec un « r » minuscule (mir), alors que le miARN mature est nommé avec un « R » majuscule (miR) ;
- Un numéro est attribué au miARN, majoritairement en suivant l'ordre chronologique dans lequel il a été découvert (exemple : miR-1) ;
- Les miARNs de la même famille, c'est à dire qui possèdent la même région « *seed* », se distinguent par une lettre (exemple : miR-1a et miR-1b) ;
- Dans le cas où un même miARN mature peut être généré à partir de plusieurs régions chromosomiques, alors un chiffre est ajouté à la fin (exemple : miR-1-1 et miR-1-2).
- Un pre-miARN produit deux brins matures, à partir de chaque extrémité : la 3' et la 5'. Ainsi, respectivement, le suffixe 3p ou 5p est ajouté (exemple : miR-1-3p et miR-1-5p) ;
- Finalement, le préfixe correspondant au nom de l'espèce dans laquelle le miARN est exprimé est ajouté au début du nom (exemple : rno-miR-1-3p pour le rat *Rattus norvegicus*).

Dans de rares cas, la nomenclature des miARNs varie en fonction de l'espèce d'intérêt. Par exemple, chez *c. elegans*, certains miARNs sont nommés « let » ou « lin ».

La découverte de nouveaux variants de miARN se fait grandissante (voir chapitre 2). La nomenclature a de grandes chances d'évoluer pour pouvoir les incorporer, mais également pour permettre une meilleure correspondance entre les différentes espèces (Desvignes et al., 2015).

1.9. Les miRNAs dans le système nerveux central.

1.9.1. Description du système nerveux central.

1.9.1.1. Brève définition du système nerveux central.

Le système nerveux central se compose de l'encéphale et de la moelle épinière. L'encéphale reçoit et intègre les informations de l'organisme et de l'environnement extérieur, puis transmet et coordonne les informations émises en réponse. La moelle épinière fait le lien entre l'encéphale et le reste de l'organisme : elle permet la transmission des signaux sensitifs de la périphérie vers l'encéphale, et la transmission des mouvements moteurs volontaires et involontaires de l'encéphale vers la périphérie.

Le système nerveux central est responsable de la réalisation des fonctions motrices, sensorielles et cognitives. L'exécution de ces fonctions est basée sur la connectivité et la nature de la communication (excitatrice ou inhibitrice) entre les neurones, l'une des cellules fondamentales qui composent le système nerveux.

1.9.1.2. La communication neuronale s'effectue via les synapses.

La communication neuronale s'effectue principalement dans les structures spécialisées appelées synapses, qui sont des zones de contact entre deux neurones, et qui peuvent être de deux types : les synapses chimiques et les synapses électriques (Liddell, 1956). Les synapses électriques se définissent comme des jonctions gap qui laissent circuler les ions d'un neurone à l'autre (Connors and Long, 2004; Meier and Dermietzel, 2006; Pereda, 2014). Les synapses chimiques transmettent l'influx nerveux à travers la libération des neurotransmetteurs par l'élément pré-synaptique, qui reconnaissent leurs récepteurs situés à la membrane de l'élément post-synaptique (Figure 8). Ces deux types de synapses coexistent dans le cerveau des mammifères, mais les détails sur leur propriétés et leurs distributions respectives sont encore débattus (Pereda, 2014).

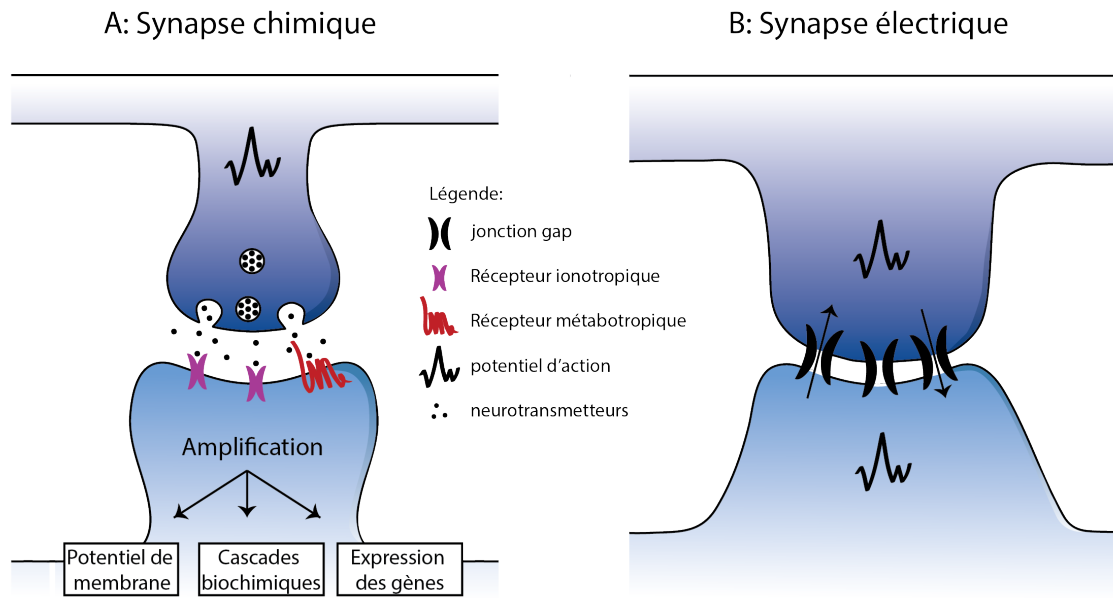


Figure 8: Représentation schématique de la synapse chimique et électrique.

A : Représentation schématique d'une synapse chimique. La dépolarisation de l'élément pré-synaptique par l'arrivée de potentiel d'action permet la fusion des vésicules synaptiques à la membrane, libérant les neurotransmetteurs dans la fente synaptique. L'élément post-synaptique présente à la surface de sa membrane des récepteurs ionotropiques et métabotropiques qui reconnaissent les neurotransmetteurs. L'activation de ces récepteurs va permettre l'intégration et la transmission du signal sous différentes formes : la variation du potentiel de membrane, l'activation de cascades biochimiques ainsi que le changement de l'expression des gènes. **B : Représentation schématique d'une synapse électrique.** Les canaux appelés jonctions gap permettent de connecter directement le cytoplasme de deux neurones adjacents. Les ions responsables du signal électrique se propagent d'un neurone à l'autre via les jonctions gap. Schéma largement inspiré de : (Pereda, 2014).

1.9.1.3. Principe de la transmission synaptique excitatrice.

La transmission synaptique excitatrice dans la synapse chimique, dont le neurotransmetteur principal est le glutamate, s'établit comme suit (Figure 9):

- La membrane de l'élément neuronal pré-synaptique est dépolarisée par l'arrivée de potentiels d'actions ;
- La dépolarisation de la membrane active des canaux calciques dépendants du potentiel, perméabilisant l'élément pré-synaptique au calcium ;
- L'entrée de calcium augmente la probabilité de libération par exocytose des vésicules synaptiques, qui contiennent des neurotransmetteurs et les libèrent dans la fente synaptique (principalement du glutamate pour les synapses excitatrices).
- Dans la fente synaptique, les neurotransmetteurs vont reconnaître et activer leurs récepteurs spécifiques situés à la membrane de l'élément post-synaptique. Cela va induire un réponse post-synaptique, qui se traduit généralement par une entrée

d'ions chargés positivement, conduisant à la dépolarisation de la membrane. Ce mécanisme permet de transmettre le signal de l'élément pré- à post-synaptique.

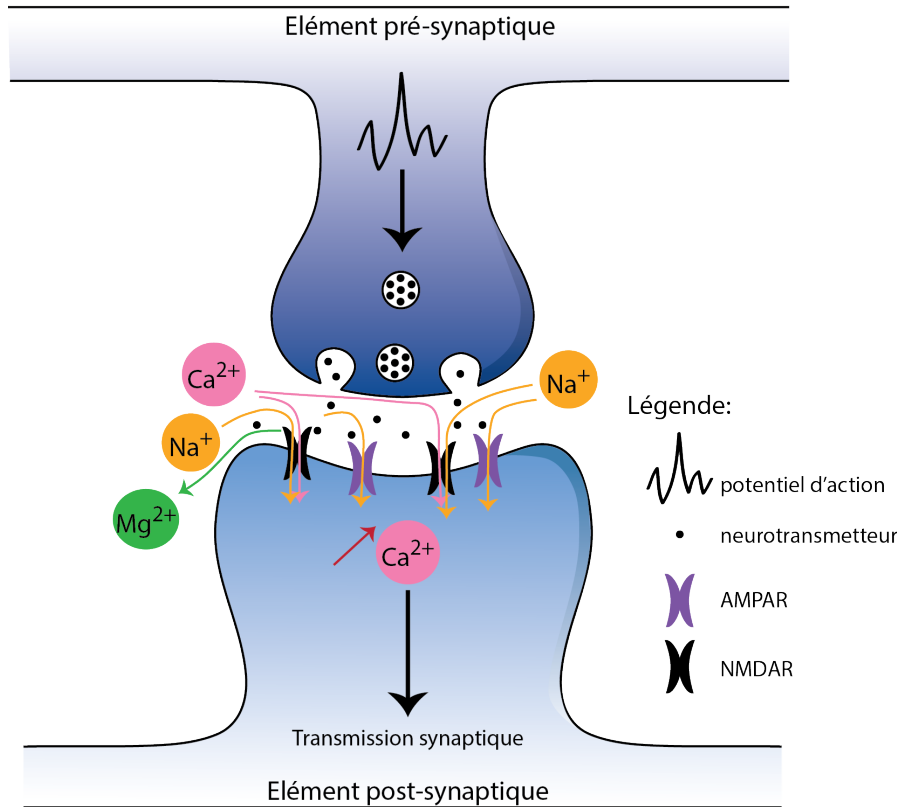


Figure 9: Représentation schématique de la transmission synaptique excitatrice dans une synapse chimique.

L'arrivée de potentiels d'actions dans l'élément pré-synaptique dépolarise la membrane, activant des canaux dépendants du voltage, et perméables au calcium. Cela entraîne une entrée de calcium dans l'élément pré-synaptique, suivie de la fusion des vésicules synaptiques, contenant des neurotransmetteurs à la membrane. Ici le neurotransmetteur est le glutamate, présent dans les synapses excitatrices. Les neurotransmetteurs reconnaissent leurs récepteurs spécifiques localisés à la membrane de l'élément post-synaptique. Pour le glutamate, ce sont principalement les récepteurs AMPA et NMDA. Les récepteurs AMPA laissent entrer du sodium, alors que les récepteurs NMDA laissent entrer du sodium et du calcium. L'entrée de charges positives dans l'élément post-synaptique permet sa dépolarisation, ainsi qu'une élévation de la concentration intracellulaire en calcium. Lors de fortes stimulations, le magnésium, qui bloque l'entrée du canal du récepteur NMDA, est éliminé. Schéma largement inspiré de : (Malenka and Nicoll, 1999).

Dans le SNC, il existe différents neurotransmetteurs (Tableau 2), et le **neurotransmetteur exciteur le plus répandu est le glutamate**. Ce dernier possède plusieurs récepteurs spécifiques, qui peuvent être métabotropiques : les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), ou ionotropiques : les récepteurs AMPA (α -

amino-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique), les récepteurs kainates, et les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Meldrum, 2000).

Tableau 2: Présentation des principaux neurotransmetteurs du SNC évoqués dans la thèse.

Neurotransmetteur	Nature principale de la transmission
GABA	Inhibitrice
Glutamate	Excitatrice

Source : (Moore, 1993).

Les estimations prévoient la présence de 100 à 200 milliards de neurones dans le cerveau humain. De plus, chaque neurone peut créer des connections synaptiques avec 5000 à 200 000 neurones (O'Carroll and Schaefer, 2013). Cela crée un réseau connectif extrêmement complexe.

1.9.1.4. La plasticité neuronale et synaptique : l'adaptation du neurone et de la synapse à l'activité.

La caractéristique essentielle du cerveau est sa capacité à se modifier, et à s'adapter aux changements continus de l'environnement et de l'organisme. Les connexions établies dans le cerveau entre les neurones ne sont pas figées, et sont soumises à des modifications constantes. La malléabilité que présente le cerveau à modifier les circuits et les connections entre les neurones est communément appelée « plasticité neuronale » (Power and Schlaggar, 2017). Ainsi, la plasticité neuronale consiste en la modulation des connections neuronales, à l'échelle d'un neurone, dépendamment de l'activité. Cela implique des modifications de l'expression des gènes, ainsi que la création et la suppression des épines dendritiques et des synapses (Schaefer et al., 2017).

Les mécanismes de plasticité se déroulent également à l'échelle de chacune des synapses, et correspondent alors à la plasticité synaptique. La plasticité synaptique se définit comme étant la capacité des synapses existantes à adapter la force et l'efficacité de leur transmission synaptique en fonction de leur activité (Citri and Malenka, 2008). La plasticité synaptique requiert des modifications fonctionnelles et structurelles (Schaefer et al., 2017), lors desquelles la force de transmission synaptique peut donc être augmentée ou diminuée, à court terme (millisecondes à minute) et à long terme (heures à jours) (Citri and Malenka, 2008).

Il existe différentes formes de plasticité synaptique à long terme, dont les principales sont les suivantes (Citri and Malenka, 2008; Kandel and Spencer, 1968; Tsukahara, 1981) :

- La **potentialisation** (ou LTP pour *long-term potentiation*). Cette forme aboutit à une augmentation persistante de la force de la transmission synaptique.
- La **dépression** (LTD pour *long-term depression*). Cette forme entraîne une diminution persistante de la force de la transmission synaptique.
- La **plasticité homéostatique**. C'est la forme de plasticité qui agit pour stabiliser l'activité d'un circuit neuronal en réponse à des changements d'activité. Cette forme de plasticité implique à la fois des modifications de la taille des synapses, ainsi que des changements de la force des synapses (Turrigiano, 2012, 2008) (Figure 10). Les neurones appliquent donc des ajustements compensatoires à la force de leurs synapses selon leur niveau d'activité (Pozo and Goda, 2010; Turrigiano, 2012).

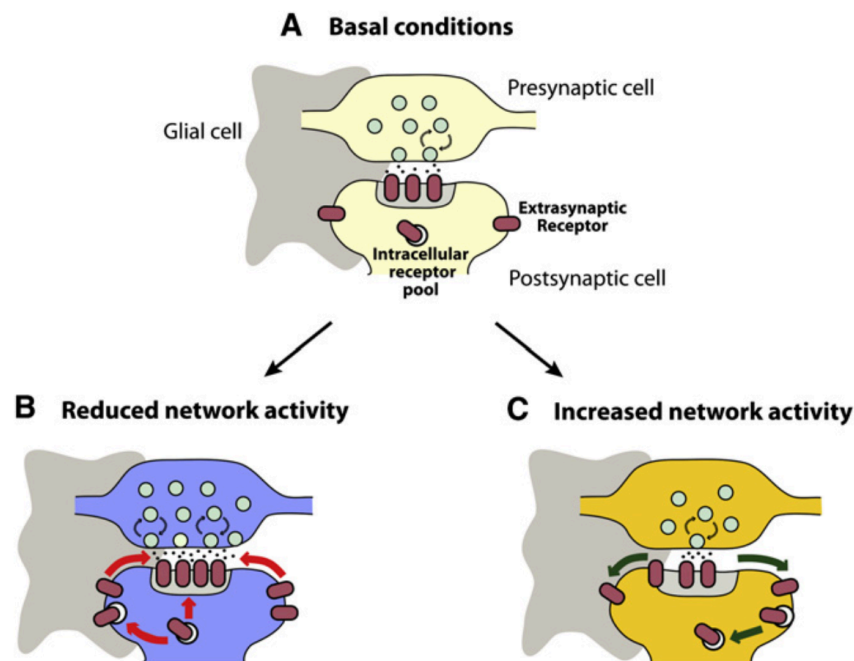


Figure 10: Schéma représentant les mécanismes principaux de plasticité synaptique homéostatique dans une synapse excitatrice.

A: Représentation schématique de la condition basale. La transmission synaptique est réalisée par la libération de neurotransmetteurs par la terminaison pré-synaptique et l'activation ultérieure des récepteurs localisés dans la membrane de la terminaison post-synaptique. **B: Représentation des**

mécanismes compensatoires en cas de réduction de l'activité du réseau. La réduction de l'activité du réseau est compensée en pré-synaptique en augmentant le recyclage des vésicules synaptiques, le nombre de vésicules ancrées à la membrane et la probabilité de libération des vésicules synaptiques. **C : Représentation des mécanismes compensatoires en cas d'augmentation de l'activité du réseau.** Pour compenser l'augmentation de l'activité du réseau, les neurones pré-synaptiques diminuent leur probabilité de libération, alors que les neurones en post-synaptique diminuent le nombre de récepteurs par des phénomènes d'endocytose et d'exocytose, ou de diffusion latérale vers les sites extra-synaptiques. Les cellules gliales, représentées en gris, peuvent aussi intervenir. Source : (Pozo and Goda, 2010).

Les principales études qui dissèquent les mécanismes de la plasticité synaptique homéostatique sont réunies dans les excellentes revues suivantes : (Pozo and Goda, 2010; Turrigiano, 2012). Pour donner un exemple lié à l'étude que nous avons menée, les premiers travaux réalisés dans cette thématique ont démontré l'implication de la régulation des courants AMPA (O'Brien et al., 1998; Turrigiano et al., 1998) au niveau des synapses excitatrices. En effet, la force de la transmission synaptique est affectée par des changements dans la composition et l'abondance des récepteurs AMPA à la surface de l'élément post-synaptique, qui se composent par la combinaison de deux dimères de dimères des sous-unités GLUA1 à GLUA4 (Hollmann and Heinemann, 1994; Traynelis et al., 2010). Les processus décrits mis en jeu sont divers : le trafic vers la membrane par exo- et endocytose, la diffusion latérale des récepteurs vers les sites extra-synaptiques ou synaptiques, ou encore l'interaction des sous-unités des récepteurs avec des protéines accessoires comme les TARPs (*transmembrane AMPAR regulatory protein*) ou des protéines d'échafaudage (Bredt and Nicoll, 2003; Collingridge et al., 2004; Elias and Nicoll, 2007; Triller and Choquet, 2008).

Par ailleurs, il a été démontré que les protocoles de blocage chronique de l'activité entraînent l'accumulation de récepteurs AMPA dans la membrane post-synaptique, et ce phénomène est en partie dû à de l'insertion à la membrane de récepteurs nouvellement synthétisés (Ju et al., 2004; Sutton et al., 2006). De façon très intéressante, la traduction des récepteurs s'effectue localement, dans les régions dendritiques (Ju et al., 2004). Ces résultats démontrent l'importance des mécanismes locaux dans les phénomènes de plasticité synaptique.

1.9.1.5. La plasticité synaptique requiert des mécanismes de régulation locaux.

Les synapses sont formées entre les dendrites et les axones, et ces structures s'étendent à des distances considérables du corps cellulaire, lieu de transcription des gènes.

Cette distance engendre des défis à relever de la part des neurones pour approvisionner les synapses lointaines en molécules structurales et de signalisation.

Pour répondre à cette question, la traduction locale des protéines a été proposée comme étant un mécanisme important dans la plasticité synaptique, et qui contribue également aux bases moléculaires de l'apprentissage et de la mémoire (Campbell and Holt, 2001; Kang and Schuman, 1996; Kim et al., 2004; Zhang and Poo, 2002). Ainsi, la synthèse locale de protéines proches des synapses est un mécanisme efficace pour contrôler temporellement et spatialement la composition des synapses.

1.9.2. L'expression des miRNAs dans le système nerveux central.

Depuis la découverte des miARNs, plus de 2000 espèces différentes ont été identifiées, parmi lesquelles 70% (Fineberg et al., 2009) sont retrouvées exprimées dans le SNC des mammifères lors de tous les stades de développement (Landgraf et al., 2007; Miska et al., 2004; Sempere et al., 2004; Shao et al., 2010). Ils sont exprimés de manière différentielle entre les régions du cerveau, et dans les différents types cellulaires (Bak et al., 2008; Landgraf et al., 2007; Olsen et al., 2009). Certains miARNs sont trouvés enrichis dans le SNC, comme par exemple les miR-128, -129 ou -138, et d'autres sont même spécifiquement exprimés dans le SNC (Landgraf et al., 2007; O'Carroll and Schaefer, 2013), et c'est particulièrement le cas du miR-124 (Lagos-Quintana et al., 2002; Sempere et al., 2004). De manière intéressante, les miARNs ont été trouvés comme étant également distribués de manière différentielle au sein même des cellules du SNC (Lugli et al., 2008; Pichardo-Casas et al., 2012).

Plus précisément, en plus des ARNm et des polyribosomes, il a été montré que les miARNs matures sont présents dans les dendrites, les axones, et les épines dendritiques des neurones (Hancock et al., 2014; Hu et al., 2014, 2015; Lugli et al., 2008; Rajasethupathy et al., 2009; Schratt et al., 2006). Aussi, certaines espèces de miARNs sont plus exprimées dans la fraction synaptique que dans l'extrait de la cellule entière. De plus, les pre-miARNs et l'enzyme DICER sont également retrouvés dans les dendrites et les axones (Bicker et al., 2013; Kim et al., 2015b; Lugli et al., 2005, 2008), et surtout les pre-miARNs peuvent être maturés en miARNs près de la synapse (Bicker et al., 2013; Hu et al., 2014, 2015; Lugli et al., 2005). Les miARNs matures peuvent être délivrés à la synapse soit par un transport depuis le corps cellulaire du miARN, soit par la maturation du stock de pre-miARN qui se trouve près de la synapse (Hu and Li, 2017; Lugli et al., 2012).

De surcroît, de nombreux travaux proposent que les miARNs jouent un rôle important dans la physiologie de la synapse. En effet, une inhibition globale de la voie de synthèse des miARNs, ou de l'activité des miARNs, provoque des effets considérables sur ces dernières. Chez les souris KO (*knock out*) pour DGCR8, la transmission synaptique basale est intacte, en revanche l'effet de stimulation à 50Hz qui provoque la dépression synaptique est exacerbé, et la phase initiale de LTP (*long term potentiation*) est diminuée dans le cortex préfrontal (Fénelon et al., 2011), alors qu'elle est augmentée dans l'hippocampe (Earls et al., 2012). Par ailleurs, l'inactivation de DICER 1 dans les neurones excitateurs de l'hippocampe cause une augmentation de la taille de l'épine dendritique, et de l'excitabilité du neurone (Davis et al., 2008; Fiorenza et al., 2016; Konopka et al., 2010). Enfin, une activité diminuée du complexe RISC par la neutralisation (KD= *knock down*) de NCOA3, un co-activateur de la transcription d'AGO2, résulte en la diminution du volume des épines dendritiques et de l'amplitude des courants miniatures post-excitateurs (Störchel et al., 2015). Ces résultats montrent que les miARNs jouent des rôles importants dans la physiologie des neurones.

Les miARNs sont impliqués dans toutes les étapes de la physiologie du SNC : le développement, la différenciation neuronale et la maturation, mais également le développement de la synapse et la plasticité synaptique. Ils sont également mis en cause comme intervenant dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives comme Parkinson, Alzheimer, Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Basak et al., 2016; Im and Kenny, 2012; O'Carroll and Schaefer, 2013; Trivedi and Ramakrishna, 2009). Ce sont donc des régulateurs majeurs intervenant dans la physiologie et la pathologie du SNC.

1.9.3. Les miARNs et la plasticité neuronale.

Les miARNs et la plasticité neuronale établissent une relation réciproque de régulation : alors que l'activité neuronale module l'expression des miARNs, ces derniers répondent en régulant la plasticité neuronale (Holt and Schuman, 2013).

1.9.3.1. L'expression des miRNAs est régulée par l'activité des neurones.

D'une manière générale, l'activité neuronale diminue l'expression de la majorité des miARNs neuronaux. Cette observation est consistante avec l'hypothèse selon laquelle

les miARNs maintiennent les transcrits des protéines impliquées dans la plasticité neuronale dans un état réprimé, qui est levé lors d'une augmentation de l'activité neuronale (Eacker et al., 2011; Im and Kenny, 2012). Cependant, il existe des exceptions pour lesquelles l'activité neuronale induit une augmentation de l'expression de miARNs particuliers (Wayman et al., 2008). Aussi, l'activité neuronale peut s'avérer nécessaire pour maintenir l'expression d'autres miARNs (Krol et al., 2010b). L'ensemble de ces démonstrations laisse penser que certains miARNs jouent un rôle actif dans la plasticité synaptique.

La régulation de l'expression des miARNs par l'activité neuronale s'applique à tous les niveaux de biogénèse des miARNs, de la transcription aux étapes de maturation, jusqu'à la stabilité et l'accessibilité des miARNs matures (Aksoy-Aksel et al., 2014; Sim et al., 2014).

L'activité neuronale joue sur le niveau de transcription des miARNs.

Les promoteurs de plusieurs espèces de miARNs comportent des sites de liaison avec des facteurs de transcription dont l'expression est régulée par l'activité neuronale, comme CREB et MEF2 (Eacker et al., 2011; Fiore et al., 2009; Vo et al., 2005).

Le miARN le plus connu et le plus étudié comme étant régulé par l'activité neuronale est le miR-132. Plusieurs études montrent une augmentation de l'expression du miR-132 après l'application de plusieurs *stimuli* de l'activité neuronale dans des cultures de neurones, comme le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), le KCl et la bicuculline (inhibiteur des récepteurs GABA, qui transmettent un signal inhibiteur) (Klein et al., 2007; Vo et al., 2005; Wayman et al., 2008). Une telle observation est également faite *in vivo* lors de protocoles de conditionnement à la peur, d'application de *stimulus* odorant, de lumière, ou encore lors de la consommation de cocaïne (Cheng et al., 2007; Im et al., 2010; Nudelman et al., 2010; Tognini et al., 2011). Par ailleurs, la réduction de l'activité neuronale dans le cortex visuel diminue à la fois la quantité des précurseurs de miR-132 ainsi que celle des matures (Mellios et al., 2011; Tognini et al., 2011). Cela appuie l'hypothèse d'une induction du miR-132 dépendante de l'activité neuronale. L'expression du miR-132 est régulée par le facteur de transcription CREB, qui active la transcription de nombreux gènes, et joue un rôle important dans le développement des dendrites et la plasticité synaptique (Sim et al., 2014). Enfin, des études pharmacologiques démontrent que l'induction du miR-132 dépend de l'activation des récepteurs NMDA, de la CAMK

(Ca^{2+} /calmodulin-dependant protein kinase) et de la voie de signalisation MEK-ERK (Cheng et al., 2007; Wayman et al., 2008).

L'activité neuronale peut jouer sur le transport des miARNs.

Plusieurs études montrent que la variation de l'activité neuronale déclenche le transport de granules à ARNs vers les synapses, qui pourraient contenir des miARNs matures ou des pre-miARNs (Charalambous et al., 2013). Dans la continuité de cette hypothèse, la protéine FMRP (*Fragile X mental retardation protein*) est contenue dans les granules à ARNs, et interagit avec les miARNs et d'autres composants du complexe RISC, comme MOV10 (Jin et al., 2004; Kenny et al., 2014).

L'activité neuronale joue sur la maturation des miARNs.

Les enzymes clés impliquées dans la maturation des miARNs, comme par exemple DICER, sont enrichies dans les synaptosomes (Lugli et al., 2005). De plus, cette étude montre aussi que l'activité de DICER est stimulée en fonction de l'activité neuronale par le clivage par la CALPAINE I (Lugli et al., 2005), une protéase calcium-dépendante qui intervient dans les réponses d'activation synaptique (Lynch and Baudry, 1987). Ce résultat suggère une augmentation de la production des miARNs dans les synapses actives. Une autre étude montre que la stimulation de la voie de signalisation ERK provoquée par l'application de BDNF stabilise le niveau de la protéine DICER via la phosphorylation d'un de ses co-facteurs TRBP (Huang et al., 2012).

Ainsi, ces études laissent penser que l'activité neuronale peut donc contrôler le niveau d'expression des miARNs en jouant sur les étapes clés de leur maturation.

L'activité neuronale peut moduler les protéines associées au complexe RISC.

L'activité neuronale entraîne la dégradation de la protéine ARMITAGE, ou de son homologue MOV 10 chez les mammifères (Ashraf et al., 2006; Banerjee et al., 2009), qui est connue pour être associée au complexe RISC. Plus particulièrement, l'augmentation de l'activité synaptique par les courants NMDA provoque la dégradation par le protéasome de la protéine MOV10, diminuant ainsi l'activité du complexe RISC (Banerjee et al., 2009).

Par ailleurs, une étude récente révèle que PICK1, une protéine sensible au calcium, qui régule le trafic des récepteurs AMPA lors de protocoles de LTP et LTD (Jaafari et al., 2012; Terashima et al., 2008), est aussi impliquée dans la régulation de la protéine AGO2

(Rajgor et al., 2017). Les auteurs montrent que PICK1 interagit avec la protéine AGO2 en condition basale, et limite son activité. Aussi, l'augmentation de l'influx calcique déstabilise le complexe PICK1/AGO2 dans les neurones corticaux. Cela permet d'une part à PICK1 d'internaliser les récepteurs AMPA, et d'autre part à AGO2 d'augmenter l'activité du complexe RISC. Les auteurs suggèrent que ce mécanisme peut entrer en jeu dans la mise en place de la LTD (Rajgor et al., 2017).

L'activité neuronale peut influencer la stabilité du miARN mature.

Une étude montre que lors de l'adaptation de la rétine à la lumière et à l'obscurité, une régulation dynamique de l'expression des miR-182, -96, -183, -204 et -201 est révélée spécifiquement dans les neurones (Krol et al., 2010b). Le mécanisme n'implique pas d'altération dans le niveau d'expression de DROSHA et de DICER, ce qui suggère qu'il doit impliquer des enzymes responsables de la stabilité ou de la dégradation des miARNs. Dans la même étude, le contexte a été étendu à des cultures de neurones, dans lesquelles l'expression des miR-124, -128 et -138 a été largement réduite après 30 min de blocage de la transcription. Cet effet est évité par l'application de tétrodontoxine qui inhibe les décharges neuronales, ce qui procure la première preuve que l'activité du réseau neuronal influence le niveau d'expression des miARNs (Krol et al., 2010b).

La séquestration des miARN matures par les ARN non-codants circulaires.

Récemment, la découverte d'une classe d'ARNs non-codants qui régule l'expression des miARNs a révolutionné la compréhension du contrôle de l'expression des miARNs. Il s'agit des ARNs circulaires non codants (ciARN), qui agissent comme des éponges à miARNs, en les séquestrant et limitant donc leur interaction avec les ARNm cibles (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013). Chez les mammifères, un grand nombre de ciARNs (une centaine) a été découvert (Rybak-Wolf et al., 2015). Ils sont fortement exprimés dans le cerveau comparé aux autres régions de l'organisme, avec une expression largement conservée entre l'Homme et la souris (Rybak-Wolf et al., 2015). D'autre part, dans les neurones, les ciARNs sont trouvés en concentration plus importante dans les dendrites et les régions synaptiques (Rybak-Wolf et al., 2015; You et al., 2015). De plus, leur expression varie en fonction de l'activité neuronale (You et al., 2015). Ces arguments en font de bons candidats pour réguler l'expression des miARNs en fonction de l'activité neuronale.

Par exemple, le ciRS-7 contient 73 sites de liaison pour le miR-7, et sa présence co-localise avec le miR-7 dans l'hippocampe. Aussi, l'inactivation de ciRS-7 mène à un développement anormal du cerveau du poisson zèbre (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013). L'hybridation entre le miR-7 et le ciRS-7 s'effectue via une complémentarité imparfaite, ce qui laisse penser que le ciRS-7 n'est pas clivé, mais qu'il retient le miR-7 et donc prévient sa liaison avec ses ARNm cibles (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013; Piwecka et al., 2017). Chez la souris, ce ciRS-7 possède également un site de liaison presque parfaitement complémentaire avec le miR-671 (Piwecka et al., 2017). Cela suggère que le miR-671 est capable de cliver le ciRS-7, et ainsi de réprimer l'inhibition du miR-7 par le ciRS-7 (Piwecka et al., 2017). Cette hypothèse reste toutefois à confirmer. De plus, des expériences d'extinction du gène du ciRS-7 montrent que l'expression de miR-7 est spécifiquement augmentée de manière post-transcriptionnelle, et qu'elle est corrélée à une diminution de l'expression de ses cibles. Par ailleurs, cela provoque un dysfonctionnement de la transmission synaptique, associé à des déficits sensorimoteurs ainsi que des troubles neuropsychiatriques. Cette étude montre donc que l'interaction entre les miARNs et les ciARNs est importante pour la fonctionnalité du cerveau (Piwecka et al., 2017).

1.9.3.2. Les miRNAs sont des acteurs de la régulation de la plasticité synaptique.

Le Tableau 3 propose une vue d'ensemble des miARNs qui ont été démontrés comme étant impliqués dans des mécanismes de la plasticité neuronale, et leur rôle associé. Bien qu'il réunisse la très grande majorité des études concernant ce sujet, ce tableau ne prétend pas être exhaustif pour autant.

L'exemple de miR-134 et de la régulation de la taille de l'épine dendritique.

Le miR-134 a été le premier miARN identifié comme étant spécifiquement exprimé dans les dendrites et les épines dendritiques (Schratt et al., 2006). De manière intéressante, la taille des épines dendritiques est sensiblement corrélée avec la force de la transmission synaptique qui s'y déroule (Bicker et al., 2014).

La surexpression du miR-134 dans les neurones d'hippocampe entraîne une réduction de la taille des épines dendritiques, dûe à l'hybridation du miR-134 sur sa cible LIMK1 (*LIM domain kinase 1*) (Schratt et al., 2006). LIMK1 phosphoryle, et donc inactive COFILIN, le facteur de dépoliarisation des filaments d'actine (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). En d'autres termes, la surexpression du miR-134 provoque une activation de la polymérisation des filaments d'actine, grâce à l'inhibition de COFILIN, qui joue un rôle répresseur. De manière intéressante, la souris KO pour LIMK1 montre une augmentation

de la LTP ainsi que des anomalies dans la morphologie des épines dendritiques (Meng et al., 2002), et ces observations sont similaires à celles réalisées à l'aide de la surexpression du miR-134 (Schratt et al., 2006).

Par ailleurs, l'inhibition de l'activité du miR-134 présente des effets opposés à ceux observés lors de sa surexpression, et diminue ainsi la taille de l'épine dendritique. De plus, la régulation proposée par miR-134 est réversible. En effet, la répression de LIMK1 par miR-134 est levée par l'action du BDNF, une neurotrophine libérée lors des stimulations synaptiques.

Une étude récente montre que la LTD des épines dendritiques induite par des courants transmis par l'activation des récepteurs NMDA, libère AGO2 de son interaction avec PICK1. La libération d'AGO2 provoque en partie une augmentation de l'activité du complexe RISC dirigé par miR-134, qui peut alors aller réprimer LIMK1, et ainsi permettre la polymérisation des filaments d'actine (Rajgor et al., 2017).

En plus de réguler la taille des épines dendritiques, le miR-134 joue un rôle important dans la croissance des dendrites. En effet, l'expression de miR-134 réprime PUM2 (Pumilio 2), une protéine impliquée dans le transport des ARNs, lors de la dendritogénèse. Des expériences de sur-expression du miR-134 *in vivo* et de son inhibition *in vitro* montrent dans les deux cas une diminution de la croissance des dendrites (Christensen et al., 2010; Fiore et al., 2009). Ces résultats suggèrent que le contrôle effectué par miR-134 du niveau d'expression de PUM2 est crucial pour la formation et la croissance des dendrites (Bicker et al., 2014).

Le miR-134 est également crucial dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire. Des expériences de conditionnement à la peur réalisées chez des souris dont SIRT1 a un site catalytique non fonctionnel, montrent que les souris ont des déficits dans les mécanismes de la plasticité synaptique, et dans la formation de la mémoire à long terme (Gao et al., 2010). Le site catalytique de SIRT1 (*histon deacetylase sirtuin1*) est capable de réprimer la transcription du miR-134. Ainsi, les souris avec SIRT1 déficiente sont accompagnées d'une sur-expression du miR-134 et de CREB, un gène clé de la plasticité, qui est également une cible de miR-134. De surcroît, la sur-expression du miR-134 chez des souris sauvages mène à une LTP aberrante et à des troubles de la formation de la mémoire dans les protocoles de conditionnement à la peur. Cela mime ainsi les observations

réalisées chez les souris avec SIRT1 déficiente. Enfin, l'inhibition du miR-134 par un oligonucléotide anti-sens restaure les niveaux d'expression de CREB ainsi que les phénomènes de plasticité et de formation de la mémoire chez les souris dont SIRT1 est déficiente (Gao et al., 2010).

Par ailleurs, la transcription du miR-134 est induite par l'activité neuronale, car l'application de KCl ou de BDNF résulte en une expression transitoire du miR-134, réalisée par la liaison du facteur de transcription MeF2 (Fiore et al., 2009).

Ainsi, le miR-134 est un exemple phare de la régulation de la traduction locale des protéines et ce de manière spatio-temporelle, exercée par les miARNs.

Une synthèse des miARNs impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique, ainsi que leurs rôles respectifs, est présentée Figure 11.

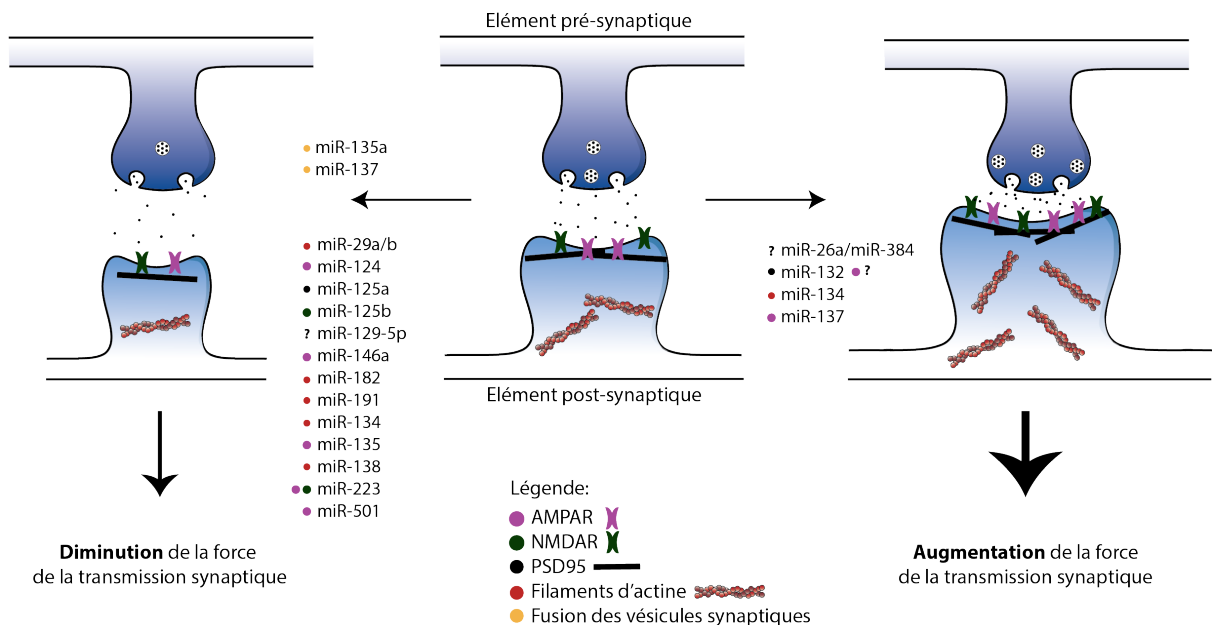


Figure 11 : Schéma récapitulatif des miARNs impliqués dans la plasticité synaptique et leur rôle.

Lors des mécanismes de plasticité synaptique, la force de transmission de la synapse peut être soit diminuée (à gauche), soit augmentée (à droite). Pour cela, un ensemble de modifications est réalisé dans les éléments pré- et post- synaptiques : un remodelage de la taille de l'épine dendritique, un changement du nombre de récepteurs ancrés à la membrane, ou encore une modification de la libération des neurotransmetteurs. Ce schéma est adapté de : (Eacker et al., 2013).

Tableau 3: Principaux miARNs impliqués dans des mécanismes de plasticité neuronale.

miARN	Cible	Paradigme de la plasticité	Référence
miR-8	FasIII, Nrg Ena/VASP	Formation des synapses Modifications morphologiques en pré-synaptique lors du développement des synapses	(Lu et al., 2014) (Loya et al., 2014)
miR-9	REST FOXG1 CAMKK2 N.D. DMD/ SAP97	Croissance des dendrites et transmission synaptique Affecté par DLX5 dans les axones en croissance Toxicité des synapses et perte des épines dendritiques dans Alzheimer Mémoire dans l'hippocampe Mémoire dans l'hippocampe, régulation de la LTP	(Giusti et al., 2014) (Garaffo et al., 2015) (Chang et al., 2014) (Malmevik et al., 2016) (Sim et al., 2016)
miR-9-3p			
miR-15a	BDNF	Régulé par MeCP2 dans les dendrites dans l'hippocampe	(Gao et al., 2015)
miR-19b	PTEN	Le développement des synapses et la synthèse des protéines synaptiques, contexte de conditionnement à la peur	(Kye et al., 2011)
miR-22	CPEB	Plasticité synaptique à long terme et mémoire	(Fiumara et al., 2015)
miR-26a	PTEN RSK3	Plasticité synaptique et morphogénèse neuronale Plasticité synaptique à long-terme	(Li and Sun, 2013) (Gu et al., 2015)
miR-29a/b	Arpc3	Remodelage du cytosquelette d'actine dans les dendrites	(Lippi et al., 2011)
miR-34a	Stx1A, Syt1 Arc N.D.	Régulé par Tap73 dans la morphologie des dendrites et la fonction synaptique LTP, LTD et plasticité synaptique adaptative Mémoire dans l'hippocampe	(Agostini et al., 2011a, 2011b) (Wibrand et al., 2012) (Malmevik et al., 2016)
miR-124	CREB IQGAP1 AMPA BDNF RhoG N.D. GluA2 N.D.	Plasticité synaptique associée à l'apprentissage chez l'aplysie LTP dans l'hippocampe, mémoire à long terme Démélinisation de l'hippocampe et performances de mémorisation Plasticité due à l'addiction à la cocaïne Complexité de l'arbre dendritique et connexion aux axones Reconnaissance de l'espace et orientation AMPA et plasticité homéostatique Mémoire dans l'hippocampe	(Rajasethupathy et al., 2009) (Gao et al., 2011; Yang et al., 2014) (Dutta et al., 2013) (Chandrasekar and Dreyer, 2009) (Franke et al., 2012; Schumacher and Franke, 2013) (Yang et al., 2012) (Hou et al., 2015) (Malmevik et al., 2016)
miR-125a	PSD95	Force synaptique et stabilisation des épines dendritiques	(Muddashetty et al., 2011)
miR-125b	Tau NR2A	LTD et performances cognitives dans Alzheimer Morphologie des épines dendritiques	(Banzhaf-Strathmann et al., 2014) (Edbauer et al., 2010)
miR-128	PHF6 N.D Szdr1/D4ertd22e, Pea15a, TARPP/Arpp21	Arborisation dendritique Régulation des mécanismes de la peur Excitabilité des dendrites en ciblant divers composants de la voie de signalisation ERK2	(Franzoni et al., 2015) (Lin et al., 2011) (Tan et al., 2013)
miR-132	p-CREB p-CREB N.D. N.D. P250 GAP Rac1 MeCP2 AMPA ? IL6, TSLP	Régulé par CREB lors de l'activité neuronale, impliqué dans la morphologie de la synapse et la synthèse protéique Plasticité des dendrites Morphologie des dendrites dans la région CA3 de l'hippocampe Mémoire de la reconnaissance et plasticité synaptique dans le cortex Formation et fonction des synapses Remodelage de l'actine de la synapse après des radiations Maturation de la synapse, synthèse des protéines synaptiques et plasticité physiologique et pathologique Transmission synaptique et plasticité dans le cortex et l'hippocampe Plasticité dans le cortex visuel et l'adaptation visuelle à l'alternance	(Nudelman et al., 2010; Vo et al., 2005) (Guo et al., 2014) (Huang et al., 2014) (Scott et al., 2012) (Dhar et al., 2014; Impey et al., 2010; Lesiak et al., 2014; Marler et al., 2014; Wayman et al., 2008) (Kempf et al., 2014) (Fukuda et al., 2005; Hansen et al., 2010; Hernandez-Rapp et al., 2015; Klein et al., 2007; Zhang et al., 2015b) (Remenyi et al., 2013) (Maya-Vetencourt and

		lumière/obscurité	Pizzorusso, 2013; Mellios et al., 2011; Tognini et al., 2011) (Hancock et al., 2014)
	Rasa1	Croissance axonale dans les DRG	
miR-134	N.D. Limk1	Régulé par SIRT-1 lors de protocoles de LTP dans l'hippocampe Taille des épines dendritiques <i>in vitro</i> et modulation de l'arborisation des neurones corticaux <i>in vivo</i>	(Gao et al., 2010) (Bicker et al., 2013; Christensen et al., 2010; Schrott et al., 2006)
	Limk1 Pumilio2	Densité des épines dans l'épilepsie Croissance dendritique et nombre de synapses excitatrices dans l'hippocampe	(Jimenez-Mateos et al., 2012) (Fiore et al., 2009; Siemen et al., 2011)
	CREB	Plasticité synaptique chez les rats épileptiques	(Zhu et al., 2015)
miR-135	Complexin1/2	Régulation du trafic des AMPAR durant un protocole de LTD dans l'hippocampe	(Hu et al., 2014)
miR-135a	Complexin1/2	Régulation de la fusion des vésicules synaptiques, comportement d'anxiété dans l'amygdale	(Mannironi et al., 2017)
miR-137	Mib1	Maturation des neurones et morphogénèse des dendrites au cours du développement	(Smrt et al., 2010)
	GluA1	Régulation de la transmission synaptique, et LTD dépendant des mGluR	(Olde Loohuis et al., 2015)
	Synaptotagmin-1	Libération des vésicules synaptiques	(Siegert et al., 2015)
miR-138	APT1	Morphogénèse de l'épine dendritique dans les neurones d'hippocampe	(Siegel et al., 2009)
	APT1 SIRT1	Synthèse de protéines synaptiques dans des protocoles de mémoire Croissance des axones pendant le développement et la régénération	(Tatro et al., 2013) (Liu et al., 2013)
miR-181	GluA2	Plasticité et fonction de la synapse, en contexte physiologique et d'addiction à la cocaïne	(Chandrasekar and Dreyer, 2009; Saba et al., 2012)
	N.D.	Création des excroissances des neurites et synaptogénèse	(Kos et al., 2016)
miR-182	Rac1, cortactine	Mécanismes de formation de la mémoire dans l'amygdale	(Griggs et al., 2013)
miR-188	Nrp-2	Développement des épines dendritiques et structure de la synapse	(Lee et al., 2012)
miR-191	Tmod2	Dépolymérisation de l'actine lors du remodelage des épines dendritiques durant un protocole de LTD dans l'hippocampe	(Hu et al., 2014)
miR-384	RSK3	Plasticité synaptique à long-terme	(Gu et al., 2015)
miR-219	CAMKII	Modulation des réponses comportementales dépendantes de la transmission via les NMDAR	(Kocerha et al., 2009)
miR-146a	Map1b	Transmission synaptique via AMPAR, endocytose des AMPAR	(Chen and Shen, 2013)
miR-338	N.D.	Croissance des neurones, guidage axonal	(Kos et al., 2017)
Cluster 183/96/82	HDAC9	Cluster régulé par PP1, régulation de la mémoire à long-terme	(Woldemichael et al., 2016)
miR-1000	VGlut	Libération de glutamate chez la drosophile	(Verma et al., 2015)
Let-7	BDNF	Plasticité due à l'addiction à la cocaïne	(Chandrasekar and Dreyer, 2009)
miR-485	SV2A	Densité des épines dendritiques, plasticité homéostatique	(Cohen et al., 2011)
miR-501	GluA1	Expression des AMPAR, remodelage des épines dendritiques	(Hu et al., 2015)
miR-92	KCC2, CPEB3, MEF2D	Remodelage de la densité des épines dendritique dans un contexte de mémoire de peur.	(Vetere et al., 2014)
miR-129-5p	Rbfox1	Plasticité homéostatique, régulation de Rbfox1, de Atp2b4 et Dcx, changement morphologique de l'épine dendritique et diminution des courants à la post-synapse	(Rajman et al., 2017)
miR-129	Kv1.1	Régulation du canal Kv1.1 dans les dendrites	(Sosanya et al., 2013)

Note : Les indications en gras représentent les études correspondant à de la plasticité homéostatique.

1.9.3.2. Les miARNs et la plasticité homéostatique.

Avant 2014, l'année de publication de notre étude, peu de travaux, à ma connaissance, concernaient l'implication des miARNs dans les mécanismes de plasticité homéostatique.

Un premier travail, réalisé par Fiore et ses collaborateurs, démontre que l'expression de miR-134 croît avec l'activité neuronale dans les cultures primaires de neurones de rat, grâce à l'augmentation de sa traduction induite par la fixation du facteur de transcription MEF2 (*myocyte enhancing factor 2*). Le miR-134 inhibe l'expression de PUM2, connue pour transporter des ARNs et impliquée dans la régulation de la morphogénèse des dendrites chez la drosophile (Ye et al., 2004). La diminution de l'expression de PUM2 par miR-134 favorise la croissance des dendrites dans les cultures primaires de neurones (Fiore et al., 2009). Cependant, les auteurs suggèrent que cette voie de signalisation peut également intervenir dans les mécanismes de plasticité homéostatique. En effet, un travail réalisé *in vivo* montre que le facteur de transcription MEF2 est un composant clé qui intervient lors des mécanismes de compensation en réponse à la prise de cocaïne, qui sont mis en place pour prévenir les réponses à long terme à la cocaïne (Pulipparacharuvil et al., 2008). Aussi, un autre travail démontre que les gènes transcrits par MEF2 dans l'hippocampe sont capables d'une part de promouvoir la croissance dendritique, et d'autre part de limiter la formation et la force des synapses, en fonction du signal reçu (Flavell and Greenberg, 2008). L'ensemble de ces résultats laisse penser que la voie de signalisation qui implique MEF2, miR-134 et PUM2 peut intervenir dans les mécanismes de plasticité homéostatique (Fiore et al., 2009).

Un deuxième travail démontre l'implication du miR-485 dans les mécanismes de plasticité homéostatique, en utilisant un paradigme d'activation de la transmission synaptique (bicuculline et 4-aminopyridine (4-AP)) dans des cultures primaires d'hippocampe. Ce paradigme augmente l'expression du miR-485, qui en retour diminue l'expression de la protéine pré-synaptique SV2A, qui contrôle la libération des vésicules synaptiques (Cohen et al., 2011). En plus de diminuer la probabilité de libération des neurotransmetteurs, miR-485 diminue également le nombre des épines dendritiques. L'ensemble de ces résultats, qui tend vers une diminution de la force de la transmission synaptique en réponse à une augmentation de l'activité synaptique, est cohérent avec les mécanismes de plasticité homéostatique (Cohen et al., 2011).

1.10. La problématique de l'étude : les miARNs participent-ils aux mécanismes de plasticité homéostatique dans les neurones d'hippocampe chez le rat ?

Plusieurs espèces de miARNs ont été mises en exergue pour le rôle crucial qu'ils exercent dans la régulation de la plasticité synaptique à long terme, dont les miR-124, miR-132, ou encore le miR-134. En revanche, peu d'études ont été réalisées avec des paradigmes de plasticité homéostatique. **Ainsi, nous nous sommes posés la question de savoir si les miARNs sont impliqués dans les mécanismes de régulation de la plasticité homéostatique.**

2. Manuscrit 1 : miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Olivier Thoumine. Il consiste à examiner le rôle des miARNs dans la régulation des récepteurs AMPA lors d'un paradigme de plasticité synaptique homéostatique, dans lequel l'activité synaptique est bloquée par un traitement de 4h qui combine la tétrodontoxine (bloque les potentiels d'action) et l'APV (un inhibiteur des récepteurs NMDA).

La sélection des miARNs dont l'expression est régulée lors du blocage de l'activité a été réalisée par RT-qPCR. Les analyses bioinformatiques de prédiction de cibles, ainsi que l'utilisation de gènes rapporteurs luciférase ont permis d'identifier le miR-92a comme étant un miARN d'intérêt qui cible la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA.

L'implication du miR-92a dans la régulation de la sous-unité GluA1 a été décryptée à l'aide des techniques d'électrophysiologie, d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ*.

Ce travail montre qu'en condition basale, le miR-92a est fortement exprimé, et réprime la traduction de GluA1. Lors du blocage de l'activité synaptique, l'expression du miR-92a est inhibée (par un mécanisme non déterminé), levant la répression de la traduction de GluA1. Cela permet l'incorporation rapide de nouvelles sous-unités GluA1 à la membrane post-synaptique, augmentant ainsi la force de la transmission synaptique.

J'ai participé aux étapes de révisions du travail, et en particulier j'ai réalisé les expérimentations d'hybridation *in situ*, les analyses et les figures associées. J'ai également contribué à la relecture du manuscrit.

Ce travail a été publié en 2014 dans le journal *Nature Neuroscience*.

miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling

Mathieu Letellier¹⁻³, Sara Elramah¹⁻³, Magali Mondin¹⁻³, Anaïs Soula^{1,2}, Andrew Penn^{1,2}, Daniel Choquet^{1,2}, Marc Landry^{1,2}, Olivier Thoumine^{1,2,4} & Alexandre Favereaux^{1,2,4}

We investigated whether microRNAs could regulate AMPA receptor expression during activity blockade. miR-92a strongly repressed the translation of GluA1 receptors by binding the 3' untranslated region of rat *GluA1* (also known as *Gria1*) mRNA and was downregulated in rat hippocampal neurons after treatment with tetrodotoxin and AP5. Deleting the seed region in *GluA1* or overexpressing miR-92a blocked homeostatic scaling, indicating that miR-92a regulates the translation and synaptic incorporation of new GluA1-containing AMPA receptors.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that inhibit protein translation by binding to the 3' untranslated region (3' UTR) of target mRNAs¹. miRNAs are abundant in the brain, with the challenge being to identify their roles and targets in specific neuronal functions². In particular, miRNAs have been shown to regulate synaptic transmission and plasticity³⁻⁶. Homeostatic synaptic scaling is a form of plasticity by which neurons make compensatory adjustments to the strength of excitatory synapses according to their activity level^{7,8}. Notably, post-synaptic AMPA receptors (AMPA), which are the major effectors of communication at glutamatergic synapses, are upregulated following activity blockade⁹. In a well-characterized procedure, treatment of hippocampal neurons with tetrodotoxin (TTX, to prevent action potentials) and AP5 (to further block NMDA receptor-mediated miniature synaptic transmission) increases the expression of GluA1 homomeric AMPARs through local translation of *GluA1* mRNAs present in dendrites¹⁰⁻¹³. Notably, GluA1 synthesis is regulated by retinoic acid production and retinoic acid receptor α binding the 5' UTR of *GluA1* mRNA¹³⁻¹⁵. However, the absence of homeostatic synaptic scaling reported with recombinant GluA1 lacking the 3' UTR^{12,16} suggests an alternative mechanism involving the regulation of AMPAR translation at the 3' UTR level. We asked whether miRNAs could regulate *GluA1* mRNA translation in response to activity blockade.

We first expressed in primary rat hippocampal neurons the 3' UTR of rat *GluA1* fused to a GFP cassette as a translation reporter. The GFP intensity measured in live cells increased steadily following TTX and AP5 treatment ($F_{3,246} = 12.83$, $P = 0.0001$) and remained constant in

untreated neurons (Fig. 1a,b), indicating newly synthesized proteins compatible with the presence of *GluA1* mRNAs in the dendrites, as identified by *in situ* hybridization (Supplementary Fig. 1a). In parallel, a 4-h TTX and AP5 treatment increased GluA1 surface immunostaining by ~2-fold ($t_{97} = 4.120$, $P = 0.0001$; Supplementary Fig. 1c,d), but did not affect *GluA1* mRNA levels compared with untreated neurons ($U = 9.00$, $P = 0.5317$; Supplementary Fig. 1b), suggesting an effect at the translational level. Together, these experiments suggested that miRNAs binding to the *GluA1* 3' UTR could be implicated in the homeostatic increase of GluA1 level in response to TTX and AP5 treatment.

We then screened for potential miRNAs targeting the *GluA1* 3' UTR using bioinformatics (Supplementary Table 1), and used quantitative RT-PCR (qRT-PCR) to detect those specifically expressed in rat nervous tissue. We identified four leading candidates (miR-92a, miR-92b, miR-128 and miR-182). The levels of miR-92a, miR-92b and miR-182 were decreased by 30–50% after TTX and AP5 treatment compared with untreated controls ($F_{7,32} = 37.38$, $P = 0.0001$), whereas miR-128 expression was unchanged (Fig. 1c). In comparison, we found no change in several miRNAs targeting the *GluA2* 3' UTR, consistent with a selective effect of TTX and AP5 on *GluA1* translation (Supplementary Fig. 2). Although miR-182 is expressed in the hippocampus, the presence of an adenosine nucleotide downstream of the seed region prevents target recognition and translational inhibition¹⁷. Furthermore, the lower effect of TTX and AP5 treatment on miR-92b versus miR-92a levels (Fig. 1c), smaller interaction energy of miR-92b with the *GluA1* 3' UTR (Supplementary Fig. 3) and competitive binding of the neuronal *Tbr2* mRNA for miR-92b¹⁸ led us to focus on the regulatory function of miR-92a. The level of miR-92a in dendrites, as detected by *in situ* hybridization, was decreased by ~70% following TTX and AP5 treatment ($F_{2,179} = 167.3$, $P = 0.0001$; Fig. 1d,e), suggesting that downregulation might be even stronger at a local level.

To determine whether there is a direct interaction between miR-92a and the *GluA1* 3' UTR, we generated reporter plasmids by fusing the 3' UTR of *GluA1* mRNA to the 3' terminus of a *Renilla* luciferase coding sequence, coexpressed these constructs in HEK cells together with miR-92a and measured luciferase activity (Fig. 2a). miR-92a significantly decreased the luciferase signal compared with a control miRNA from *C. elegans* with no reported target in mammals (miR-Ctl), reflecting its potency to inhibit *GluA1* translation ($F_{2,33} = 67.32$, $P = 0.0001$; Fig. 2b). We observed no decrease of luciferase mRNA levels following miR-92a expression ($t_8 = 1.343$, $P = 0.2163$; Fig. 2c), indicating that miR-92a inhibits translation and does not promote mRNA degradation. When coexpressed with a mutated form of the *GluA1* 3' UTR containing a deleted target region (3'UTR- Δ seed), miR-92a did not decrease the luciferase signal, indicating that the selective binding of miR-92a to the *GluA1* 3' UTR represses gene translation (Fig. 1b).

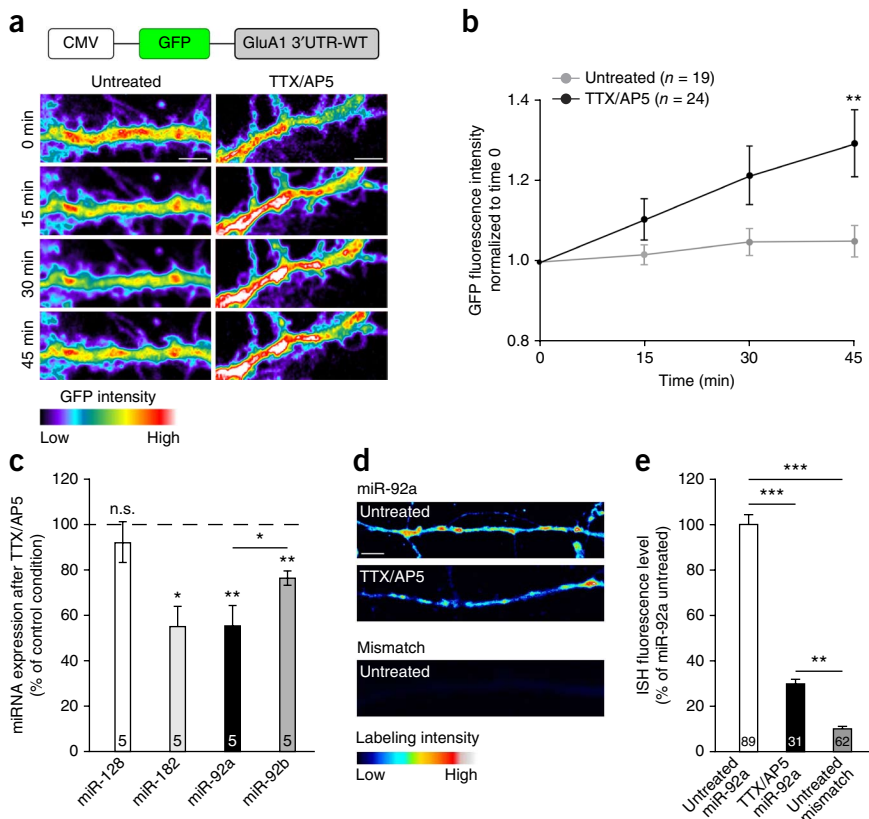
¹University of Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, Bordeaux, France. ²CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, Bordeaux, France. ³These authors contributed equally to this work. ⁴These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to A.F. (alexandre.favereaux@u-bordeaux.fr) or O.T. (othoumin@u-bordeaux.fr).

Received 6 February; accepted 18 June; published online 13 July 2014; doi:10.1038/nn.3762

Figure 1 Regulation of GluA1 mRNA translation and miRNA levels on homeostatic scaling.

(a) Time lapse fluorescence images of GFP fused to the GluA1 3' UTR in TTX/AP5-treated and untreated neurons. Scale bar represents 2 μ m. (b) GFP intensity over time, normalized to the level for the initial time point (repeated measure two-way ANOVA, $**P < 0.01$ after 45-min exposure). (c) Expression levels of miRNAs targeting GluA1 mRNA quantified by qRT-PCR, performed on extracts of neurons treated with TTX/AP5 and normalized to untreated cultures (ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, n.s. indicates not significant, $P = 0.354$). (d) miR-92a *in situ* hybridization (ISH) in TTX/AP5 treated and untreated neurons; a mismatch probe was used in untreated neurons to assess labeling specificity scale bar: 5 μ m. (e) Normalized miRNA expression levels (ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). All data are presented as mean + s.e.m. and the number of experiments is indicated in the bars.

We then assessed the ability of miR-92a to modulate recombinant GluA1 expression in neurons under basal and synaptic scaling conditions. We designed GluA1 constructs containing an N-terminal super-ecliptic (SEP) tag and fused them with either the wild-type GluA1 3' UTR (SEP-GluA1-3'UTR-WT) or a 3' UTR lacking the miR-92a binding region (SEP-GluA1-3'UTR- Δ seed). A twofold increase in SEP-GluA1-3' UTR-WT surface level was induced by TTX and AP5 (Kruskal-Wallis = 9.682, $P = 0.0215$; Fig. 2d,e), consistent with a selective



increase of GluA1 translation in this protocol^{10,12}. This effect was still observed in transected dendrites (Supplementary Fig. 4a,b), suggesting a local effect, and was blocked by cycloheximide (Supplementary Fig. 4c,d), indicating a requirement for new protein synthesis, as previously reported^{10,12}. In control conditions, surface SEP-GluA1-3' UTR- Δ seed levels were twofold higher than SEP-GluA1-3'UTR-WT (Fig. 2d,e), indicating that endogenous miR-92a strongly represses GluA1 translation by binding the GluA1-3' UTR. This strategy to

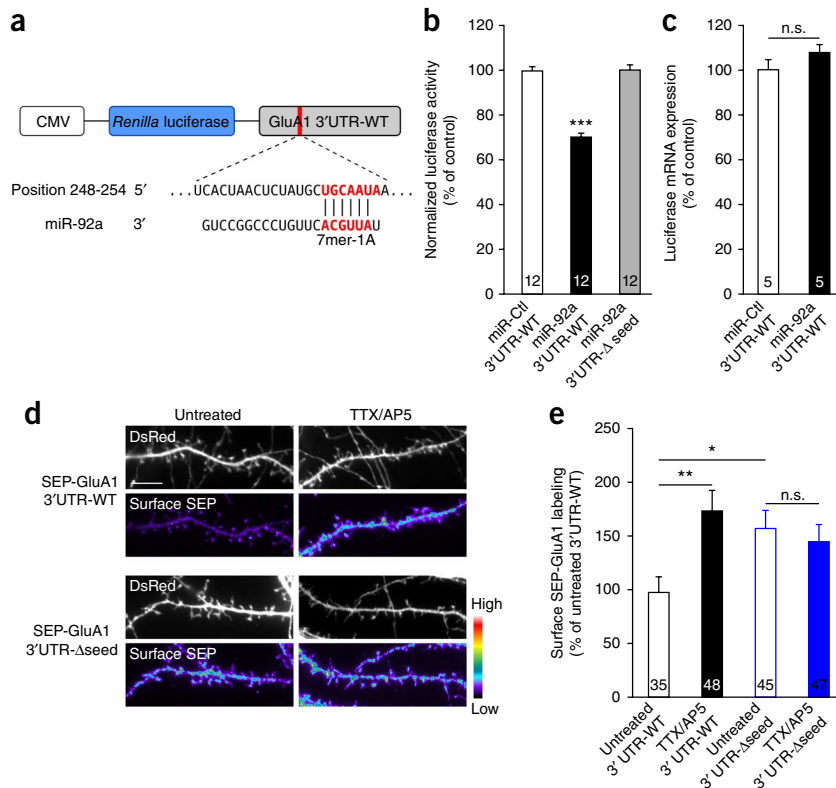


Figure 2 miR-92a represses recombinant GluA1 expression.

(a) HEK-293 cells were co-transfected with a Renilla luciferase reporter fused to the GluA1 3' UTR, together with miR-Ctl or miR-92a; seed region is highlighted in red. (b) Levels of luciferase activity were normalized to miR-Ctl. To check for binding specificity, we also used 3'UTR- Δ seed (ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test, $***P < 0.001$). (c) Luciferase mRNA expression was normalized to miR-Ctl-treated cells (Student's *t* test). (d) Antibody to GFP surface staining (false colors) and intracellular DsRed (white) in 15 d *in vitro* (DIV) neurons expressing SEP-GluA1-3'UTR-WT or SEP-GluA1-3'UTR- Δ seed, treated or not with TTX/AP5 for 4 h. Scale bar represents 10 μ m. (e) GluA1 surface levels in the four conditions normalized to untreated SEP-GluA1-3'UTR-WT (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, n.s. indicates not significant, $P = 0.5739$). All data are presented as mean + s.e.m. and the numbers of experiments are indicated in the bars.

Figure 3 miR-92a regulates endogenous GluA1-containing AMPAR expression on homeostatic scaling. **(a)** Homer1c-GFP (green) and GluA1 surface staining (red) in 15 DIV neurons transfected with miR-Ctl or miR-92a, in TTX/AP5-treated or untreated neurons. Scale bar represents 10 μm . **(b)** GluA1 synaptic levels in all conditions, normalized to the miR-Ctl untreated condition (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). **(c)** Representative recordings of AMPAR-mEPSCs from 14–15 DIV neurons and averaged traces in the same conditions. **(d)** Mean AMPAR-mEPSC amplitudes for each condition (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test, $*P < 0.05$, n.s. indicates not significant, $P = 0.2396$). All data are presented as mean + s.e.m. and the number of experiments is indicated in the bars.

compete for the interaction between the GluA1 3' UTR and miR-92a was more powerful and selective than using hybridizing locked nucleic acids to inhibit endogenous miR-92a, which reduced GluA1 surface levels by only 20% (**Supplementary Fig. 5**). Notably, expression of SEP-GluA1-3'UTR- Δ seed occluded the effect of TTX and AP5 treatment (**Fig. 2d,e**), suggesting that homeostatic scaling requires the miR-92a-dependent de-repression of GluA1 translation.

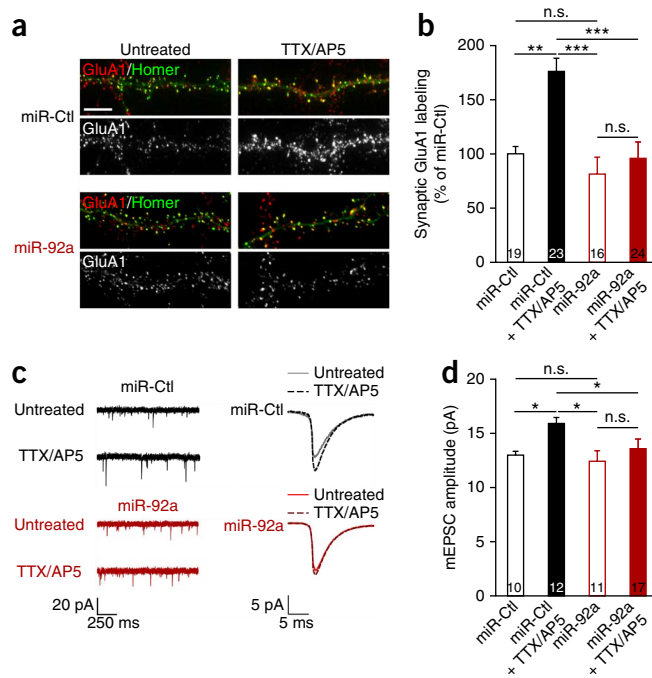
Finally, we assessed whether exogenous miR-92a could modulate endogenous AMPAR expression following homeostatic scaling induction. Neurons were co-transfected with either miR-92a or miR-Ctl, together with Homer1c-GFP as a synaptic marker, and either treated or not treated with TTX and AP5. Half the cultures were surface immunostained for GluA1 and the other half were processed for patch-clamp recordings of AMPAR-mediated miniature EPSCs (AMPA-mEPSCs). As expected, treatment of neurons expressing miR-Ctl with TTX and AP5 increased both GluA1 synaptic staining (Kruskal-Wallis = 24.69, $P = 0.0001$; **Fig. 3a,b**) and AMPAR-mEPSC amplitude ($F_{3,46} = 3.549$, $P = 0.0006$; **Fig. 3c,d**), but not frequency (**Supplementary Fig. 6a**), confirming a postsynaptic effect^{10,12}. TTX and AP5 treatment was also accompanied by decreases in mEPSC rise-time (**Supplementary Fig. 6b**) and decay-time constants (**Supplementary Fig. 6c,d** and **Supplementary Table 2**), which were previously linked to the synaptic incorporation of GluA1 homomers^{12,19}. Notably, miR-92a overexpression blocked those increases in synaptic GluA1 staining (**Fig. 3a,b**) and mEPSC amplitude (**Fig. 3c,d**), as well as the kinetic changes induced by TTX and AP5 treatment (**Supplementary Fig. 6b–d**), thereby compensating for the loss of endogenous miR-92a caused by the scaling protocol. In untreated neurons, exogenous miR-92a resulted in a slight decrease in surface GluA1 staining (**Fig. 3a,b**) and AMPAR-mEPSC amplitude (**Fig. 3c,d**) compared with neurons expressing miR-Ctl, further supporting the idea that high endogenous miR-92a levels strongly repress basal *GluA1* mRNA translation, an inhibition that is relieved in homeostatic scaling conditions.

Together, our data indicate that miR-92a selectively regulates GluA1 translation and is necessary for the synaptic scaling associated with incorporation of new GluA1 receptors during activity blockade in hippocampal neurons. This type of regulation may cooperate with other mechanisms underlying synaptic scaling, including retinoic acid signaling^{13,14}, β -CamKII activation²⁰ and the miR-485 presynaptic target SVA2 (ref. 5). A question for the future is how activity deprivation alters the level of miRNAs upstream of their effects on mRNA translation.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Accession codes. GenBank: *Grial* 3' UTR, [KF914645](#).



Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the [online version of the paper](#).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge B. Tessier, D. Bouchet, C. Breillat, N. Retailleau, C. Genueur, F. Neca and R. Sterling for cell culture and technical assistance, and the Bordeaux Imaging Center for microscopy support. We acknowledge Y. Goda and Y. Le Feuvre for helpful comments on the manuscript. This work received funding from the Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale pour la Recherche (grant MirPAIN), Conseil Régional Aquitaine and Fondation pour la Recherche Médicale.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M. Letellier, S.E., M.M., O.T. and A.F. designed the experiments and wrote the manuscript. M. Letellier, S.E., M.M., A.S., A.P., O.T. and A.F. performed the experiments and data analysis. M. Letellier, A.S., D.C., M. Landry, O.T. and A.F. revised the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Bartel, D.P. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
- Kosik, K.S. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 754–759 (2009).
- Edbauer, D. *et al. Neuron* **65**, 373–384 (2010).
- Lambert, T.J., Storm, D.R. & Sullivan, J.M. *PLoS ONE* **5**, e15182 (2010).
- Cohen, J.E., Lee, P.R., Chen, S., Li, W. & Fields, R.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 11650–11655 (2011).
- Karr, J. *et al. J. Cell Biol.* **185**, 685–697 (2009).
- Pozo, K. & Goda, Y. *Neuron* **66**, 337–351 (2010).
- Turrigiano, G.G. *Cell* **135**, 422–435 (2008).
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C. & Nelson, S.B. *Nature* **391**, 892–896 (1998).
- Sutton, M.A. *et al. Cell* **125**, 785–799 (2006).
- Cajigas, I.J. *et al. Neuron* **74**, 453–466 (2012).
- Ju, W. *et al. Nat. Neurosci.* **7**, 244–253 (2004).
- Aoto, J., Nam, C.I., Poon, M.M., Ting, P. & Chen, L. *Neuron* **60**, 308–320 (2008).
- Poon, M.M. & Chen, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20303–20308 (2008).
- Maghsoodi, B. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16015–16020 (2008).
- Heine, M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20947–20952 (2008).
- Jalvy-Delvaile, S. *et al. Nucleic Acids Res.* **40**, 1356–1365 (2012).
- Nowakowski, T.J. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 7056–7061 (2013).
- Thiagarajan, T.C., Lindskog, M. & Tsien, R.W. *Neuron* **47**, 725–737 (2005).
- Groth, R.D., Lindskog, M., Thiagarajan, T.C., Li, L. & Tsien, R.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 828–833 (2011).

ONLINE METHODS

Molecular constructs and miRNA target prediction. Rat *GluA1* mRNA sequence (encoded by the *Gria1* gene) was PCR amplified and cloned from a brain cDNA library. The *Gria1* 3' UTR was sequenced (GenBank accession code KF914645) and miRNA target sites prediction was performed with the Targetscan algorithm²¹. A 976-bp fragment of *Gria1* 3' UTR containing miR-92a/b, miR-182 and miR-128 sites was cloned into a modified phRL-CMV vector (Promega) for luciferase experiments and in pEGFP-C1(Clontech) to produce GluA1 translation reporter. To study the regulation of GluA1 by candidate miRNAs, a construct was produced by fusing the GluA1 sequence downstream to super-ecliptic (SEP) sequence and adding either the wild-type 3' UTR sequence or a 3' UTR sequence deleted of the miR-92a seed region. For the miR-92a expression construct, a genomic sequence spanning at least 150 bp upstream and 150 bp downstream of the mature miRNA sequence was PCR amplified and cloned into pcDNA3.1 (Invitrogen). Deletion of the seed regions in *Gria1* reporters were achieved using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

qRT-PCR. Total RNA was purified with the TRI Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. For mRNAs, cDNA was synthesized using RevertAid H-Minus first-strand synthesis kit (ThermoScientific) and primed with oligo-dT primers. For miRNAs, cDNA was synthesized using Ncode-VILO first-strand synthesis kit (Invitrogen). PCR amplification was performed on a LightCycler LC480 (Roche) with primer pairs designed to span exon boundaries and to generate amplicons of ~70 bp. Primer sets for *Sdha*, *U6*, *Gria1*, miR-30a, miR-30c, miR-92a, miR-92b, miR-128, miR-181, miR-182 and miR-486 were tested by qRT-PCR and gel electrophoresis for the absence of primer-dimer artifacts and multiple products. Triplicate qRT-PCR reactions were done twice for each sample, using transcript-specific primers (600 nM) and cDNA (10 ng) in a final volume of 10 μ l. The LightCycler 480 SYBR Green I Master qPCR kit (Roche) was used according to manufacturer's instructions. The Ct value of each gene was normalized against that of *Sdha* and *U6*. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method²².

Cloning primers. *Gria1* 3' UTR Fw: 5' GCGCGCCTCGAGTGGAGCAGAC AGGAAACC 3'

Gria1 3' UTR Bw: 5' GCGCGCGGTACCGACAAGAATCATGTATG GCACC 3'

miR-92a Fw: 5' GCGCGCGTACTGCTTACGAGCACTTACAG 3'

miR-92a Bw: 5' GCGCGCCTCGAGAGCTTGTTTCACTAATGAGG 3'

Gria1 3' UTR miR-92a/b seed mutation

Fw: 5' GAAGATGGTCACTAATGATGATGGGAGAAATCCTGTCCGA GG 3'

Gria1 3' UTR miR-92a/b seed mutation

Bw: 5' CCTCGGACAGGATTCTCCCATGCATAGTTAGTGACCATC TTC 3'

qRT-PCR primers. *U6* Fw: 5' GGAACGATACAGAGAAGATTAGC 3'

U6 Bw: 5' AAATATGGAACGCTTCACGA 3'

SDHA Fw: 5' TGCGGAAGCAGCGAAGGAGT 3'

SDHA Bw: 5' CTTCTGCTGGCCCTCGATGG 3'

miR-30a Fw: 5' TGTAACATCCTCGACTGGAAG 3'

miR-30c Fw: 5' TGTAACATCCTACTCTCAGC 3'

miR-92a Fw: 5' TATTGCACTTGTCGGCCCTG 3'

miR-92b Fw: 5' TATTGCACTCGTCCCGGCCCTCC 3'

miR-128 Fw: 5' TCACAGTGAACCGGTCTCTTT 3'

miR-181 Fw: 5' AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT 3'

miR-182 Fw: 5' TTTGGCAATGGTAGAATCACACCG 3'

miR-486 Fw: 5' TCCTGTACTGAGCTGCCCGAG 3'

HEK-293 cell culture and luciferase assay. HEK-293 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Luciferase assay was conducted as previously described²³. Briefly, we used a dual reporter system, with an empty *Firefly* luciferase vector (pGL3, Promega) as transfection control. Normalized *Renilla* luciferase activity was expressed as a ratio of reporter to control vector activities.

Neuronal culture and transfection. Primary rat hippocampal neurons were isolated from Sprague Dawley E18 male and female embryos and cultured as described²⁴. For miRNA screening, 15 DIV neurons were left untreated or treated for 4 h with a combination of 2 μ M TTX and 50 μ M AP5, then processed for RNA extraction and qRT-PCR. For immunocytochemistry and electrophysiology experiments, cells were co-transfected after 10 DIV with Homer1c-GFP and either miR-92a, Cel-miR-67 or empty vector at a ratio of 1:2, using a lipofection protocol (Effecten, Qiagen), and processed at 14–15 DIV. For experiments using recombinant SEP-GluA1-containing AMPARs, cells were co-transfected at 10 DIV with Dsred and SEP-GluA1 3'UTR-WT or SEP-GluA1-3'UTR- Δ seed at a ratio of 1:2. Cells were used for experiments at 14–15 DIV.

Immunocytochemistry and *in situ* hybridization. For staining of surface AMPARs, neurons incubated live for 10 min at 37 $^{\circ}$ C with a rabbit antibody to the N-terminal domain of GluA1 (Agrobio, clone G02141) diluted to 1:100 in culture medium. Cells were fixed and stained with a secondary antibody conjugated to Alexa 568 (Invitrogen, A10042, 1:800). The GluA1 fluorescent signal (Agrobio, clone G02141, 1:100) at Homer1c-GFP clusters (Roche, 11814460001, 1:200) was quantified as described²⁵. For staining of surface SEP-GluA1, neurons incubated live for 10 min at 37 $^{\circ}$ C with a mouse antibody to GFP (Roche, 11814460001) diluted to 1:200 in culture medium. Cells were fixed and stained with a secondary antibody conjugated to Alexa 647 (Invitrogen, A31571, 1:800). An intensity threshold was applied on the Dsred signal to define the neurite contour and the surface SEP signal was measured within this area. For *in situ* hybridization of GluA1 mRNAs and miR-92a miRNAs, double-digoxigenin locked nucleic acid probes (Exiqon) were used at a final concentration of 20 and 40 nM, respectively. Hybridization was performed according to the manufacturer's instructions; digoxigenin was revealed with a tyramide-based method.

Electrophysiology. Neuronal cultures were placed on the two-dimensional motorized stage (Siskiyou 200cri) of an upright microscope (Leica DM6000FS). Transfected cells were identified by epifluorescence. Whole-cell patch-clamp recordings were carried out at 22–25 $^{\circ}$ C using micropipettes controlled by a motorized micromanipulator (Sutter Instrument MP225) and plugged to a patch-clamp amplifier (HEKA EPC10). The recording chamber was continuously perfused with an artificial cerebrospinal fluid containing 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 0.1 mM picrotoxin (pH 7.33, osmolarity adjusted to 290 mOsm). 0.5 mM TTX was added to block sodium channels when recording mEPSCs. The intracellular solution contained 100 mM potassium gluconate, 17 mM KCl, 5 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 4 mM ATPK2, 0.5 mM GTPNa (pH 7.3, osmolarity adjusted to 280 mOsm). Recorded neurons were held under voltage clamp at -70 mV and series resistance was left uncompensated. Pipette resistance was 4–6 M Ω and only cells with stable resting potential < -50 mV and series resistance < 20 M Ω were analyzed. mEPSCs were recorded over a period of 3–10 min, filtered at 2 kHz and sampled at 10 kHz using the Patchmaster software (HEKA). Amplitude, frequency and kinetics of the events were analyzed using mini analysis software (Synaptosoft). The detection threshold was set at -5 pA. Cells with a noisy or unstable baseline were discarded. Inspection of the raw data was done to eliminate any false event.

Statistical analyses. For normally distributed data (as determined by the Shapiro normality test), differences were tested using the two-tailed Student's *t* test and ANOVA test in case of three or more groups. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used when criteria for normality were not met. Newman-Keuls and Dunn's tests were used as multiple-comparison *post hoc* tests.

A **Supplementary Methods Checklist** is available.

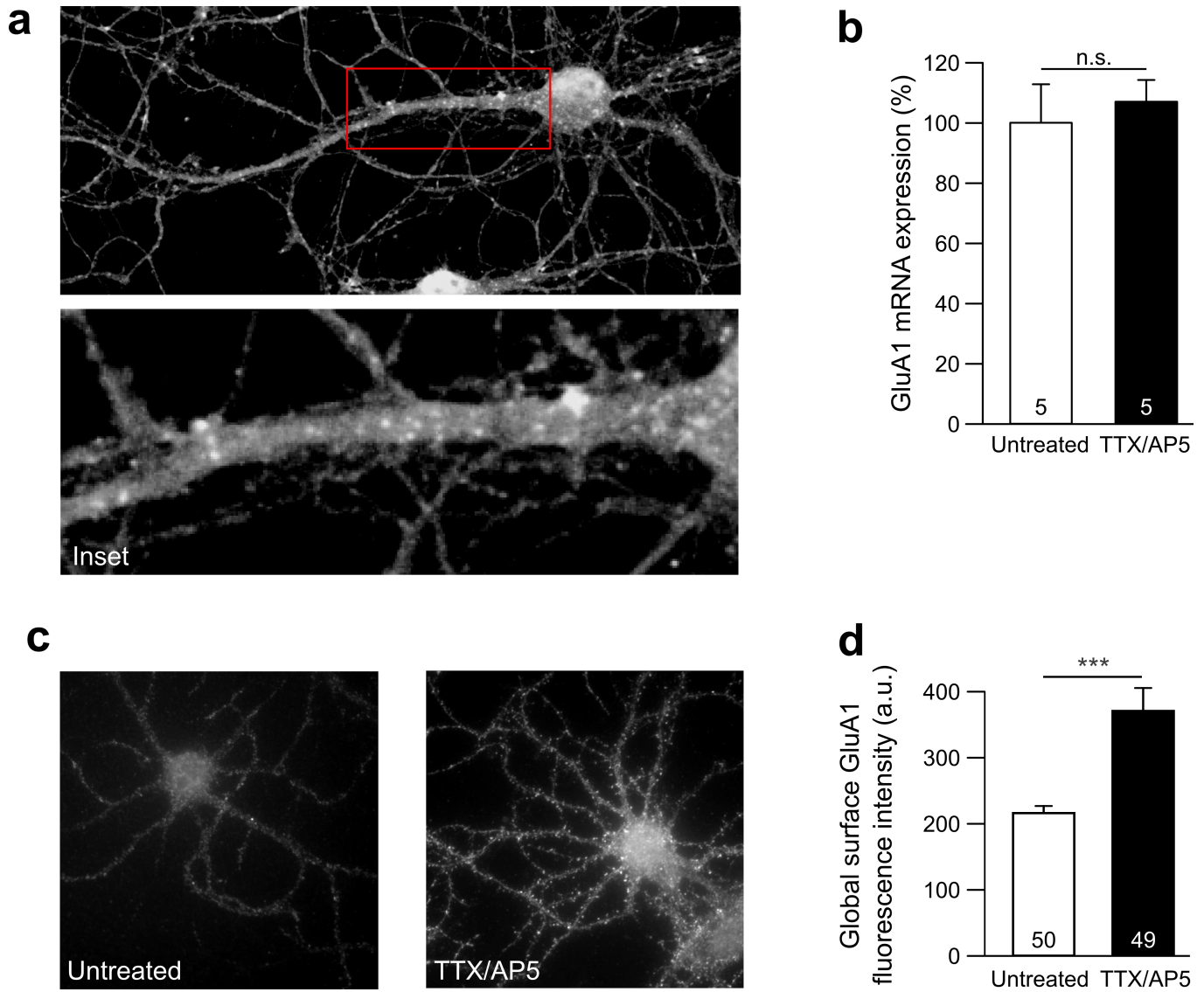
21. Lewis, B.P., Burge, C.B. & Bartel, D.P. *Cell* **120**, 15–20 (2005).

22. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

23. Favereaux, A. *et al.* *EMBO J.* **30**, 3830–3841 (2011).

24. Kaech, S. & Banker, G. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–2415 (2006).

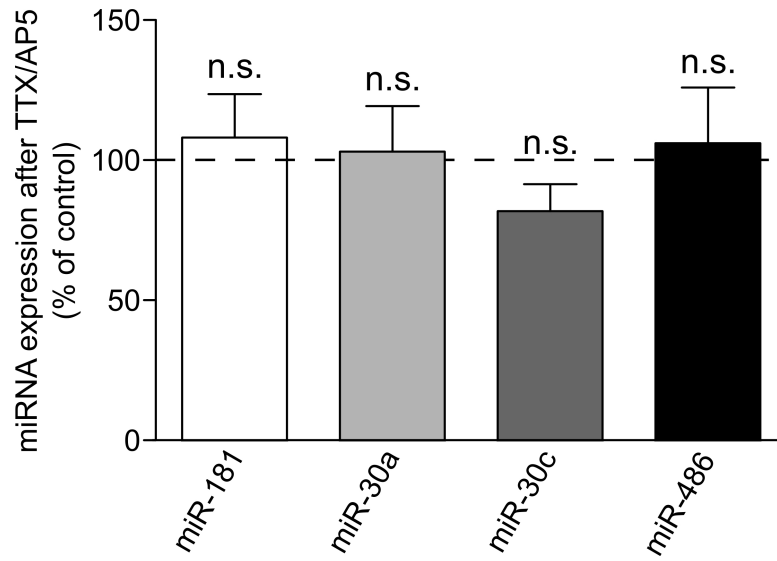
25. Mondin, M. *et al.* *J. Neurosci.* **31**, 13500–13515 (2011).



Supplementary Figure 1

Homeostatic scaling of GluA1 is transcription independent.

(a) In situ hybridization of GluA1 mRNAs in 15 DIV neurons. (b) GluA1 mRNAs quantified by qRT-PCR in TTX/AP5-treated and untreated neurons (Wilcoxon rank sum test, $U = 9$, $P = 0.5317$, data are represented as mean + SEM). (c) 15 DIV neurons were treated with TTX/AP5 for 4 h or untreated, and endogenous AMPARs were live labeled with an anti-GluA1 antibody. (d) Quantification of GluA1 surface staining in dendrites (Student t-test, $t(97) = 4.120$, $*** P = 0.0001$, data are represented as mean + SEM and the number of experiments is indicated in the bars).

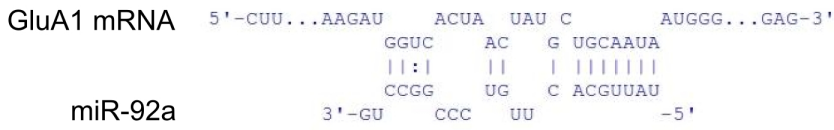


Supplementary Figure 2

Expression level of miRNAs targeting GluA2.

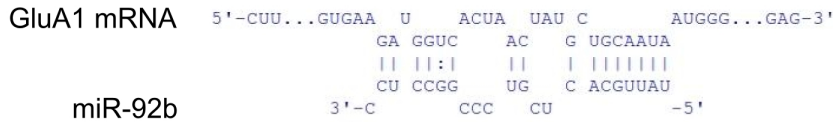
Four brain-specific miRNAs were also predicted to target the GluA2 mRNA (*Gria2* gene). The levels of these miRNAs were quantified by QRT-PCR analysis on extracts of neurons treated with TTX/AP5, and normalized to untreated cultures. None of the four miRNAs tested was significantly regulated in response to TTX/AP5 treatment, ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test ($F(7,28) = 0.2288$, $P = 0.9749$, data are represented as mean + SEM and the number of experiments is indicated in the bars).

a



Energy	-6.4 kcal/mol
Hybridization Energy	-11.9 kcal/mol
Unfolding Energy - mRNA	4.9 kcal/mol
Unfolding Energy - miRNA	0.5 kcal/mol

b

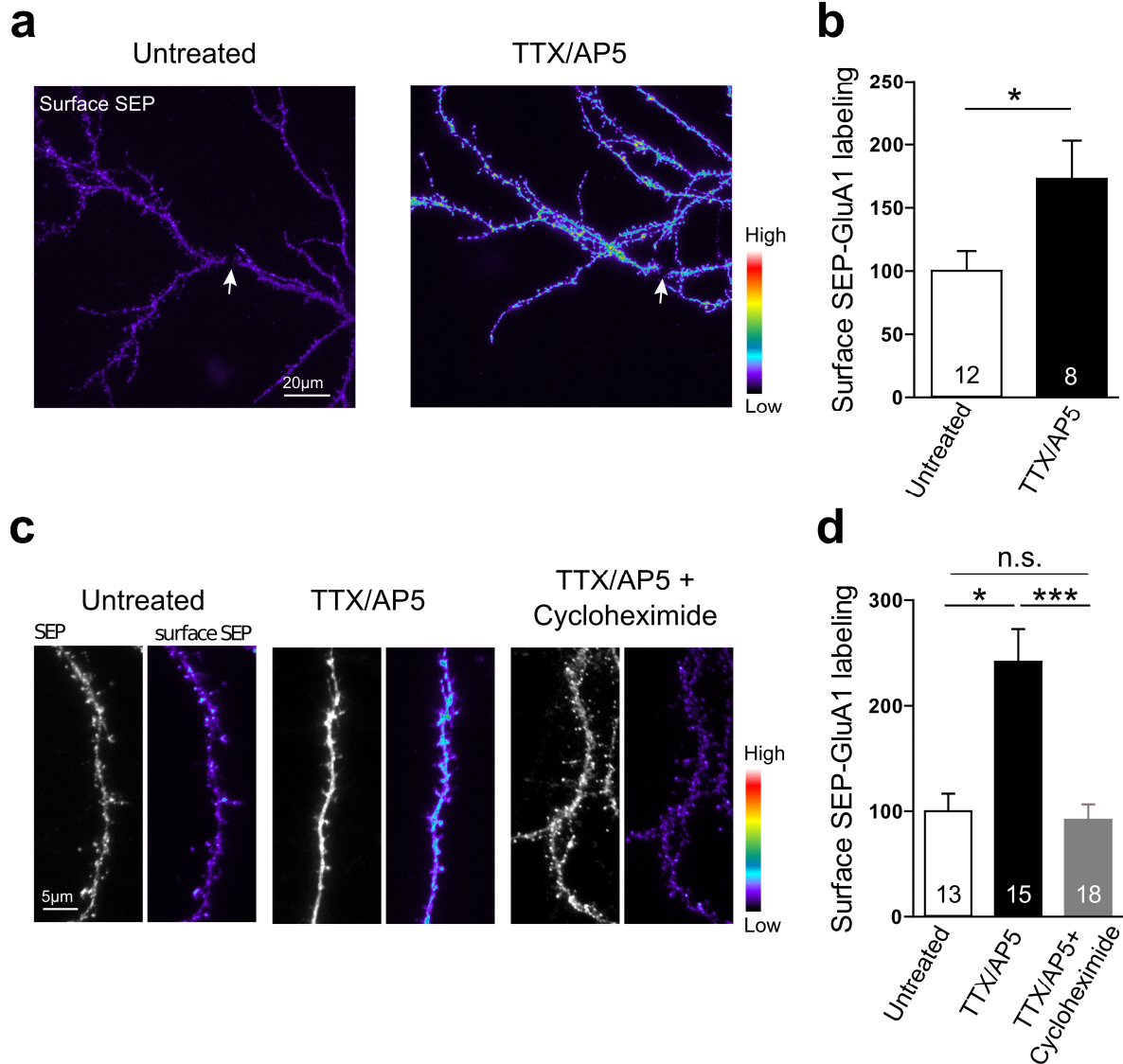


Energy	-5.8 kcal/mol
Hybridization Energy	-11.5 kcal/mol
Unfolding Energy - mRNA	5.1 kcal/mol
Unfolding Energy - miRNA	0.6 kcal/mol

Supplementary Figure 3

miRNA-mRNA interaction prediction for miR-92a/b and *GluA1* mRNA.

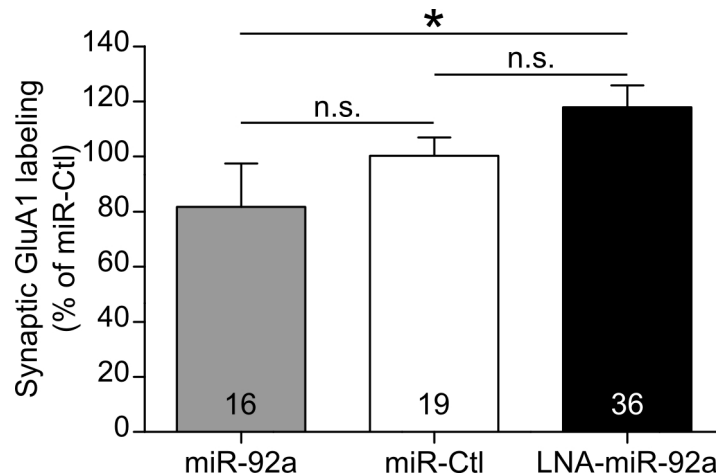
Hybridization energies between *GluA1* mRNA and miR-92a or miR-92b were predicted with intRNA tool (v1.2.5). Thermodynamic parameters are moderately in favor of a miR-92a-*GluA1* interaction.



Supplementary Figure 4

Homeostatic scaling of GluA1 is local and translation dependent.

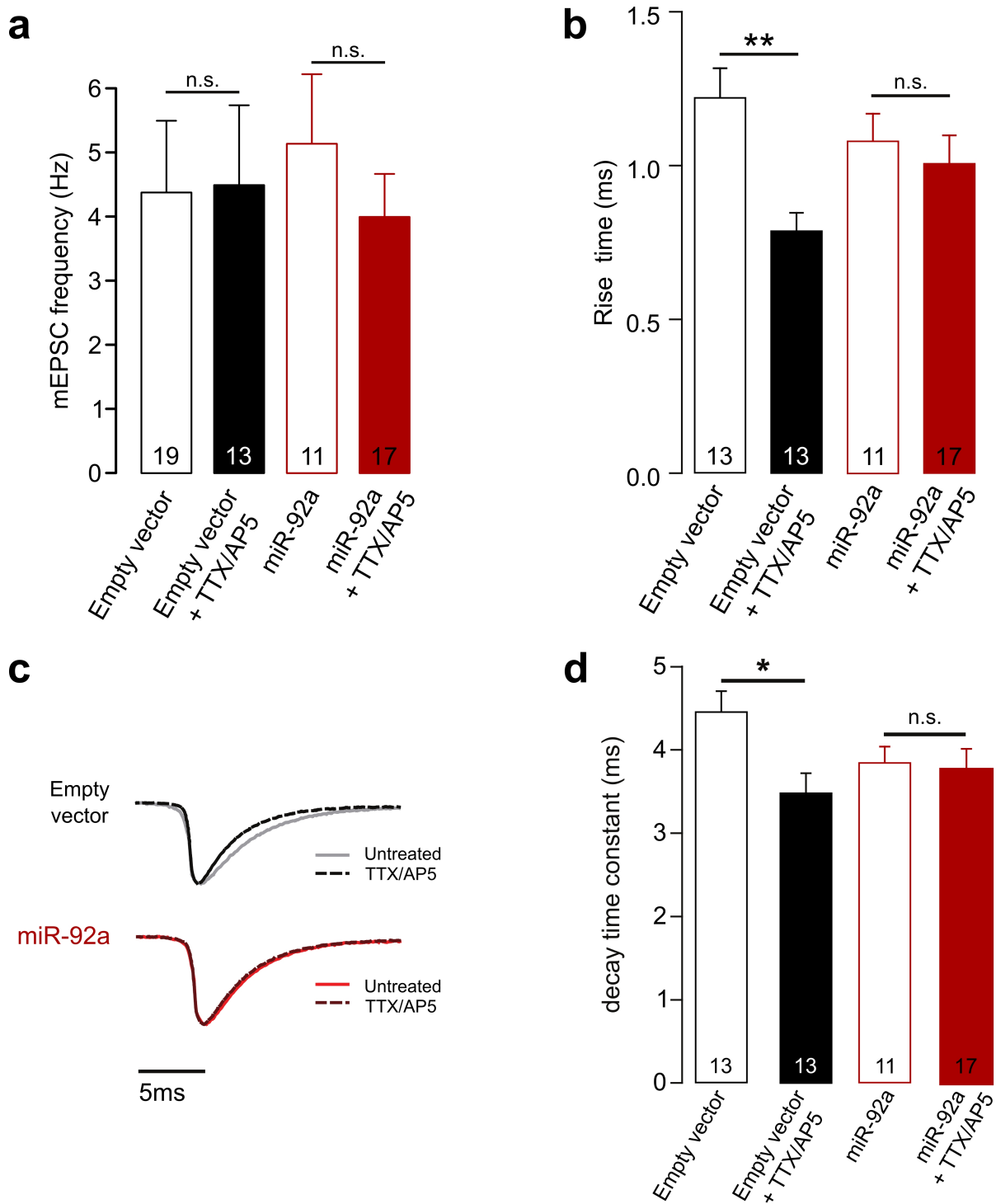
(a) Dendrites from 15 DIV neurons expressing SEP-GluA1-3'UTR-WT were transected using a micropipette (arrows), then neurons were placed back in the incubator for 4 h, with or without TTX/AP5. Surface GFP immunolabeling is shown in false colors. (b) The level of anti-GFP staining in transected dendrites was normalized to untreated condition. TTX/AP5 treatment induces a strong increase in GluA1 surface expression, suggesting a local effect (Student t-test, $t(18) = 2.333$, $* P = 0.0314$). (c) 15 DIV neurons expressing SEP-GluA1-3'UTR-WT were treated with TTX/AP5, or TTX/AP5 + cycloheximide, or left untreated for 4 h, then processed for anti-GFP surface immunostaining. The SEP (white) and anti-GFP (false colors) images are shown. (d) Protein synthesis blockade with cycloheximide occludes GluA1 scaling in response to TTX/AP5 treatment, demonstrating the requirement for protein translation (Kruskal-Wallis statistic = 14.23, $P = 0.0008$, followed by Dunn's multiple comparisons test, $* p < 0.05$, $*** p < 0.001$). All data are represented as mean + SEM and the number of experiments is indicated in the bars.



Supplementary Figure 5

Modulating miR-92a basal levels moderately regulates GluA1 expression.

Neurons were transfected at DIV 12 with exogenous miR-92a, miR-Ctl, or LNAs against endogenous miR-92a, and surface immunostained for GluA1 at DIV 15. The immunostaining levels were quantified for the three conditions. There is a significant difference between the miR-92a and LNA conditions but not between the miR-92a, or the LNA, and the control condition (Kruskal-Wallis test, Kruskal-Wallis statistic = 7.101, $P = 0.0287$, followed by Dunn's multiple comparisons test, $* p < 0.05$). The small and not significant effect of exogenous miR-92a on GluA1 level indicates that the basal level of endogenous is high and tightly controlled in neurons. The small and not significant effect of the LNA to endogenous miR-92a on the surface GluA1 level may be due to the fact that LNA directed against miR-92a do not only target the interaction between miR-92a and GluA1 but also have an impact on all other miR-92a targets. In addition, this might explain the toxic effects of the LNAs on neurons (not shown). Indeed, since only neurons showing no gross morphological signs of alteration were selected, it is possible that those neurons are the ones that take up the less LNAs. Such small quantities of LNAs might then not be sufficient to compete with endogenous miR-92a.



Supplementary Figure 6

Influence of TTX/AP5 treatment on mEPSC kinetics.

(a) AMPAR-mediated mEPSC frequency measured by electrophysiology. Neither TTX/AP5 treatment nor miRNA expression have any effect (Kruskal-Wallis test, Kruskal-Wallis statistic = 10.25, $P = 0.0685$). (b) Summary of mean mEPSC 10-90% rise-time, TTX/AP5 treatment induced a faster rise-time in neurons expressing empty vector but not for neurons overexpressing miR-92a (ANOVA, $F(3, 50) = 3.637$, $P = 0.0188$, followed by Newman-Keuls multiple comparison test, $** p < 0.01$). (c) Average scaled traces of AMPA mEPSCs in the different conditions. Note a faster decay after TTX/AP5 treatment for neurons expressing empty vector but not for neurons

expressing miR-92a. (d) mEPSC decay time constants for the different conditions. Since the contribution of series resistance and whole-cell capacitance to the time constant of the voltage clamp was invariant across recording conditions (Table S2), we rule out this effect as a potential cause of our measured rise time and decay kinetics. Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis statistic = 8.117, $P = 0.0134$) followed by Dunn's multiple comparisons test ($* p < 0.05$). All data are represented as mean + SEM, and the number of cells examined is indicated in the bars.

miRNA	Mature sequence	Nervous system expression
rno-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	No
rno-miR-32-5p	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA	No
rno-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG	Yes
rno-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	Yes
rno-miR-96-5p	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	No
rno-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	Yes
rno-miR-137-3p	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	No
rno-miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG	Yes
rno-miR-363-3p	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGU	No

Supplementary Table 1: Bioinformatics prediction of miRNAs targeting GluA1 mRNA.

According to Targetscan, 9 miRNAs were predicted to target GluA1 mRNA (*Gria1* gene), but by qRT-PCR we found that only four are significantly detected in the nervous system.

		Untreated	TTX/AP5
Ra (MΩ)	Empty vector	14.5 ± 0.6	14.7 ± 0.8
	miR-92a	14.6 ± 1.3	13.7 ± 0.6
C (pF)	Empty vector	53.3 ± 4.7	45.6 ± 4.2
	miR-92a	60.9 ± 6.5	53.8 ± 4.5

Supplementary Table 2: Passive properties of recorded neurons.

Series resistance and input capacitance were not significantly different between untreated or treated cells transfected with empty vector or miR-92a.

3. Discussion, perspectives et conclusion.

Le travail auquel j'ai participé dévoile le rôle d'un miARN particulier, le miR-92a, dans un mécanisme de régulation de la plasticité homéostatique, dans lequel l'activité synaptique est inhibée. Dans ce mécanisme, le miR-92a contrôle l'expression de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA. En condition basale, nous avons montré que le miR-92a réprime l'expression de GluA1. Lors d'un blocage de l'activité neuronale, la répression exercée par le miR-92a est levée, permettant l'incorporation de GluA1 à la membrane de la synapse. Les récepteurs AMPA sont formés par l'association de 2 dimères, principalement des sous-unités GluA1 et GluA2. Lorsque le récepteur ne possède pas la sous-unité GluA2, ce dernier devient perméable à la fois au sodium et au calcium (CP-AMPA) (Aoto et al., 2008; Sutton et al., 2006). La perméabilité supérieure au calcium entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire calcique dans l'élément post-synaptique, et donc un meilleur transfert de l'information. Cette insertion compense la diminution de la transmission synaptique imposée par le traitement au TTX/APV que nous avons réalisé.

3.1. Les miARNs, de nouveaux acteurs dans la régulation de la plasticité homéostatique.

Depuis le travail que nous avons réalisé, d'autres études concernant le rôle des miARNs dans la plasticité homéostatique ont été menées.

Des premiers résultats, détaillés dans le chapitre 1, paragraphe 1.9.3.2, proposaient que la voie de signalisation qui implique MEF2, miR-134 et PUMILIO-2 (PUM2) pouvait intervenir dans les mécanismes de plasticité homéostatique (Fiore et al., 2009). L'équipe a confirmé cette hypothèse quelques années plus tard (Fiore et al., 2014), et le travail a été publié quelques mois après le nôtre. Ce travail utilise un paradigme de plasticité homéostatique dans lequel l'activité synaptique est augmentée. Les auteurs montrent le rôle pivot joué par le miR-134. Lors d'une forte activité synaptique chronique, miR-134 inhibe l'expression de PUM2, une protéine capable de se lier aux ARNs, dans le compartiment synapto-dendritique. Cette action est liée à une diminution du nombre de synapses. De plus, cette étude montre que PUM2 se lie à l'ARNm de Plk2 (*Polo-like kinase 2*), et que le complexe PUM2/Plk2 intervient dans l'inhibition de l'incorporation de GluA2 à la surface de la post-synapse. Cette étude met en lumière le rôle crucial joué par le miR-134, qui intervient à la fois dans les mécanismes d'élimination des synapses, et dans la diminution

de l'expression des récepteurs AMPA à la surface de la post-synapse. Ces deux phénomènes sont communément retrouvés dans les mécanismes de dépression synaptique homéostatique, qui apparaissent à la suite d'une augmentation chronique de l'activité.

Une deuxième étude a été réalisée à ce sujet. Le travail de Hou et de ses collaborateurs (Hou et al., 2015) montre qu'en condition basale, l'expression du miR-124 est inhibée par le facteur de transcription EVI1 en association avec la déacétylase HDAC1. Lorsque l'activité synaptique est diminuée (traitement TTX/APV pendant 15h), l'expression de miR-124 est augmentée, et ce dernier régule spécifiquement la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA. Comme nous l'avons évoqué, les récepteurs AMPA sont formés par l'association de 4 sous-unités, et la majorité contient la sous-unité GluA2, qui est perméable uniquement au sodium et au potassium. Lorsque le récepteur ne possède pas la sous-unité GluA2, ce dernier devient perméable à la fois au sodium et au calcium (CP-AMPA) (Aoto et al., 2008; Sutton et al., 2006). Ainsi, la diminution observée de l'expression de la sous-unité GluA2 par le miR-124, pourrait mener à la formation de CP-AMPA, permettant l'accélération des processus de plasticité homéostatique mis en place lors d'une carence en activité. Cette hypothèse est en adéquation avec les résultats que nous proposons.

Cependant, l'étude réalisée par Hou et ses collaborateurs est néanmoins en légère contradiction avec une étude précédente (Ho et al., 2014). Cette dernière démontre également la régulation opérée par miR-124 sur GluA2. En revanche, les auteurs démontrent que l'interaction se réalise dans le corps cellulaire des neurones, et non dans les dendrites. Cette conclusion est donc peu compatible avec le mécanisme de régulation locale proposé précédemment. Cependant, la différence peut s'expliquer par la variation des traitements utilisés.

Plus récemment, dans un modèle de neurones d'hippocampe traités à la picrotoxine, un inhibiteur des récepteurs GABA-A (transmission inhibitrice) qui permet d'augmenter l'activité synaptique, il est montré que miR-129-5p est aussi impliqué dans le mécanisme de la plasticité homéostatique (Rajman et al., 2017). Concrètement, en condition basale, RBFOX1, une protéine qui se lie aux ARNs, permet l'expression de la pompe à calcium ATP2B4 et de DCX (doublecortin), qui sont toutes deux des cibles du miR-129-5p. Sous picrotoxine, l'expression de miR-129-5p est augmentée par un mécanisme inconnu, et ce miARN inhibe à la fois l'expression de RBFOX1, ainsi que celle

de ATP2B4 et DCX. Associées à cette observation, une diminution de la taille des épines dendritiques ainsi qu'une diminution des courants post-synaptiques sont également relevées. Cette étude montre que le miR-129-5p est crucial pour la régulation synaptique homéostatique induite par une augmentation de l'activité, à la fois dans le changement de la morphologie des épines dendritiques que pour l'efficacité de l'influx nerveux (Rajman et al., 2017).

L'ensemble de ces études, ainsi que la nôtre, met en lumière que les miARNs sont des acteurs clés dans les mécanismes de régulation de la plasticité synaptique homéostatique. En particulier, elles révèlent que la balance excitatrice/inhibitrice à la synapse peut être régulée par les miARNs, de manière locale et rapide, en réponse à la variation de l'activité neuronale.

3.2. L'expression de miR-92a est régulée par l'activité neuronale, mais comment ?

L'implication des miARNs dans la régulation des mécanismes de plasticité homéostatique induit que l'expression de ces derniers est régulée par la modification de l'activité neuronale. Dans notre étude, nous observons que l'expression du miR-92a varie en fonction de l'activité neuronale, et nous nous sommes posés la question du mécanisme sous-jacent qui intervient. Dans l'introduction, nous avons évoqué au paragraphe 1.9.3.1. divers mécanismes qui permettent de moduler l'expression des miARNs en fonction du changement de l'activité neuronale :

- Le niveau de transcription ;
- Le transport ;
- La maturation ;
- La modulation des protéines associées au complexe RISC, qui influencent son efficacité ;
- La stabilité des miARNs matures ;
- L'accessibilité des miARNs matures.

Récemment, une étude montre élégamment que la maturation des miARNs, en l'occurrence miR-181a, est contrôlée par l'activité synaptique (Sambandan et al., 2017). Pour répondre à cette question, les auteurs ont développé un outil qui consiste en un ARN de synthèse qui a la séquence et la structure du pre-miR-181a. Cet ARN de synthèse possède un fluorophore dans la future séquence du miARN mature, localisé à la base de la

structure en boucle. Aussi, un quencher est localisé dans la boucle. Ainsi, lorsque cet ARN est présent sous forme de précurseur, la fluorescence est inhibée par la présence du quencher dans la boucle. En revanche, lorsque l'ARN est maturé par DICER, le quencher est éliminé avec la structure en boucle, et le miARN mature émet de la fluorescence. Cet outil permet donc d'évaluer le taux de maturation du miR-181a par DICER (Sambandan et al., 2017). A l'aide de cette stratégie, les auteurs ont montré que l'augmentation de l'activité synaptique a pour conséquence d'intensifier la maturation du miR-181a localement, au niveau des dendrites. Cela est corrélé avec une diminution de l'expression de sa cible CAMK2 au niveau des synapses (Sambandan et al., 2017).

Bien que les mécanismes sous-jacents qui amènent à une augmentation locale de la maturation du miR-181a n'aient pas été élucidés, cette étude propose un premier élément de réponse. Ainsi, il serait intéressant d'approfondir notre étude, en développant par exemple une stratégie similaire pour miR-92a. Cela nous permettrait de comprendre les mécanismes mis en œuvre lors de la variation de l'activité neuronale, qui permettent de moduler rapidement et localement l'expression du miR-92a.

3.3. Un travail en collaboration que se poursuit avec l'équipe d'Olivier Thoumine.

A la suite de ce travail, l'intérêt pour cette thématique nous a mené à continuer le travail de collaboration sur ce sujet. Nous avons réalisé quelques tests préliminaires, pour évaluer la régulation d'autres protéines de la synapse lors de paradigmes de plasticité homéostatique. Lors de l'inhibition de l'activité neuronale avec un traitement TTX/APV pendant 4h, nous observons une diminution de l'expression de l'ARNm de Nlg3 (*neuroligin 3*), corrélée à l'augmentation de l'expression de certains de ses miARNs cibles, comme miR-101a-3p et miR-219a-5p (Figure 12). La NLG3 est une protéine d'échafaudage des synapses excitatrices, qui permet le recrutement des récepteurs AMPA (Heine et al., 2008). Il serait intéressant de continuer l'investigation pour évaluer l'importance de la régulation de la protéine NLG3 par les miARNs dans un paradigme de plasticité homéostatique.

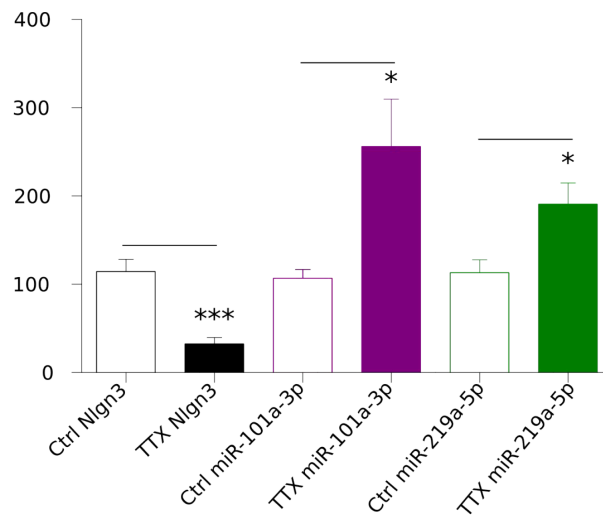


Figure 12: Résultat de RT qPCR pour quantifier l'expression de la Nlg3 et des miARNs cibles.

Des cultures primaires d'hippocampe ont été traitées ou non 4h avec un cocktail TTX/APV. L'expression de la Nlg3 ainsi que de ses miARNs cibles déterminés par prédiction bioinformatique à l'aide de Targetscan, a été étudiée par RT qPCR. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la condition contrôle (sans TTX/APV). Seuls les miARNs régulés sont représentés sur la figure. Un test de Mann & Whitney a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism, et la significativité est acceptée pour une *p-value* < 0,05.

Aussi, d'autres tests préliminaires, réalisés avec un paradigme de diminution de l'activité synaptique par un traitement TTX de 48h, ont montré une tendance à la diminution de l'expression du miR-124, corrélée à une augmentation de sa protéine cible synaptopodine (Figure 13). La synaptopodine est responsable de la formation des *spine apparatus* localisés à la base des grandes synapses excitatrices matures, et joue un rôle dans les phénomènes de plasticité des épines (Segal et al., 2010). Le *spine apparatus* est une structure retrouvée à la base des épines dendritiques des synapses excitatrice matures. Il est en continuité avec le réticulum endoplasmique lisse, et sert de stockage au calcium. Ainsi, le *spine apparatus* est considéré comme étant important pour l'approvisionnement local des épines dendritiques matures en protéines et calcium (Segal et al., 2010). Les résultats obtenus par RT qPCR à partir des cultures primaires ne sont pas significatifs, mais proposent une tendance claire. Les mécanismes hypothétiques mis en jeu sont locaux, c'est pourquoi d'autres techniques telles que l'immunocytochimie et l'hybridation *in situ* sont réalisées pour confirmer ce résultat. En particulier, une augmentation de l'expression de la synaptopodine est observée par immunocytochimie suite à 48h de traitement à la TTX. Ce travail fait actuellement l'objet de la thèse de Sandra Dubes, dans l'équipe d'Olivier Thoumine.

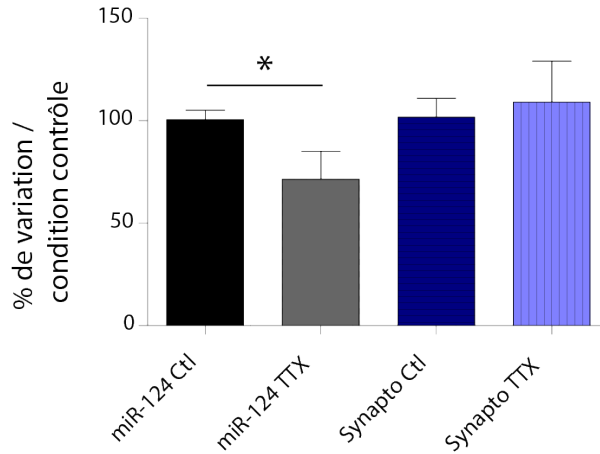


Figure 13: Représentation de la quantification par RT qPCR de l'expression de miR-124 et de l'ARNm de la Synaptopodine.

Des cultures primaires d'hippocampe ont été traitées ou non 48h avec de la TTX. L'expression de l'ARNm de la Synaptopodine et de miR-124 a été étudiée par RT qPCR. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la condition contrôle (sans TTX). Un test de Mann & Whitney a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism, et la significativité est acceptée pour $p\text{-value} < 0,05$.

Pour conclure, le premier travail auquel j'ai participé pendant ma thèse a ouvert de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes de régulation de la plasticité homéostatique, en mettant la lumière sur une classe d'acteurs particulière : les miARNs. Dans le but de mieux caractériser les mécanismes mis en œuvre, il est indispensable d'avoir une vision générale de l'expression de l'ensemble des miARNs dans les cellules du SNC, ainsi que leur répartition sub-cellulaire : expression dans le corps cellulaire, les dendrites, les axones, aux synapses. Pour cela, la première étape est de bien connaître l'ensemble des espèces de miARNs exprimées dans le SNC.

CHAPITRE 2

Détermination du miRNome de 5
structures du système nerveux central.

Chapitre 2 : Détermination du miRNome de 5 structures du système nerveux central.

1. Introduction.

1.1. Définition du miRNome.

Le miRNome correspond à l'ensemble des espèces de miARNs exprimées ainsi que leur quantité, lors d'un stade développemental défini ou d'une condition physiologique particulière, dans un tissu ou une structure biologique d'intérêt.

1.2. Le référencement des miRNAs.

1.2.1. La base de données miRBase.

Pour centraliser les données croissantes réalisées sur les miARNs, et répertorier l'ensemble des miARNs découverts à travers tous les modèles d'étude, la création d'une base de données s'est révélée être indispensable. Actuellement, il en existe plusieurs qui co-existent, cependant la base de données de référence, libre d'accès, est incontestablement miRBase (Griffiths-Jones, 2006, 2010) (<http://mirbase.org>).

La base de données miRBase référence tous les miARNs découverts par modèle d'étude, propose un moteur de recherche par mots-clés, met à disposition le contexte de la découverte du miARN avec un lien vers la littérature d'origine, et apporte des détails sur le contexte génomique. Par ailleurs, elle assure la fonction d'assigner les noms officiels des nouveaux miARNs avant leur publication (Griffiths-Jones et al., 2006).

1.2.2. Implémentation différente selon les espèces de miRBase.

Actuellement, miRBase référence les miARNs pour la majorité des modèles biologiques, comme les virus, les plantes et les métazoaires. Cependant, la diversité des miARNs référencés est inégale selon le modèle étudié. En effet, miRBase propose chez l'Homme (*Homo sapiens*), 1881 précurseurs et 2588 miARNs matures (GRCh38), chez la souris (*Mus musculus*) 1193 précurseurs et 1915 matures (GRCm38), alors que chez le rat (*Rattus norvegicus*) seulement 495 précurseurs et 765 matures (Rnor_5.0) sont référencés (Griffiths-Jones, 2006). Le rat est un modèle d'étude très usité en sciences, en particulier

dans le domaine des neurosciences. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer la différence de miARNs référencés entre le rat comparé à l'Homme et la souris : **1)** soit la majorité des espèces de miARNs a déjà été découverte, et le rat est un organisme qui compte moins de miARNs que les autres, **2)** soit la recherche sur les miARNs est moins développée chez le rat que chez les deux autres organismes, diminuant les opportunités d'en découvrir de nouveaux. Notre hypothèse penche vers le deuxième postulat : peu de miARNs chez le rat sont annotés sur la base de données miRBase car moins d'études ont été réalisées chez cette espèce pour examiner leurs rôles et fonctions (Nombres d'entrées sur une recherche Pubmed pour les mots clés « miRNA et espèce » : 3251 pour le rat ; 13536 pour la souris ; 44849 pour l'Homme).

1.3. Les technologies de détection et quantification des miARNs, et de découverte de nouvelles espèces de miARNs.

1.3.1. Les principales techniques de détection et de quantification des miARNs.

Les miARNs possèdent des caractéristiques qui les rendent difficiles à détecter et quantifier : ils sont de petite taille, ils ne possèdent pas de caractéristique commune distinctive (les ARNm possèdent par exemple une queue poly(A) qui leur est spécifique), et leur expression varie au cours du temps et en fonction du tissu d'intérêt, en plus d'être parfois très faible (de Planell-Saguer and Rodicio, 2013).

Malgré ces difficultés, il existe différentes méthodes pour les détecter et les quantifier, et chacune possède ses avantages et ses inconvénients (Tableau 4). Les méthodes les plus couramment utilisées sont les suivantes :

- La transcription réverse suivie d'une PCR quantitative (**RT qPCR**). Le principe consiste à ajouter une queue poly(A) aux miARNs matures puis à les réverse transcrire en ADN complémentaire (ADNc). Ensuite, les brins d'ADNc sont quantifiés par amplification PCR (*polymerase chain reaction*) quantitative et la mesure de l'intensité de la fluorescence, en utilisant une amorce spécifique complémentaire du miARN, et une amorce universelle qui reconnaît une séquence adaptatrice ajoutée lors de l'étape de transcription réverse (Schmittgen et al., 2008). Une autre alternative, appelée méthode Taqman, est l'utilisation d'une sonde spécifique pour un miARN donné, sur laquelle est greffée un fluorophore et un quencher (Heid et al., 1996).

- **La PCR digitale en goutte.** Cette technique est entièrement basée sur la RT qPCR, et la différence réside dans le fait que les réactions de PCR sont subdivisées physiquement en mixtures qui agissent séparément, permettant la quantification absolue des acides nucléiques (Hindson et al., 2011, 2013).
- **L'hybridation *in situ*.** Cette méthode permet de visualiser l'expression des miARNs dans les cellules et les tissus, sur le principe de la détection de l'hybridation d'une sonde spécifique complémentaire à la séquence du miARN (McDougall et al., 1972).
- **Les analyses de microarray.** Suivant le même principe que l'hybridation *in situ*, les miARNs sont purifiés d'extraits cellulaires puis hybridés sur des plaques qui possèdent des sondes spécifiques complémentaires à la séquence des miARNs d'intérêts (Duan et al., 2011; Liu et al., 2008).
- **Le séquençage d'ARN (RNA-Seq).** Cette méthode consiste à déterminer la présence et quantifier le niveau d'expression par une méthode de séquençage haut-débit. C'est actuellement la seule méthode qui permet de découvrir la présence de nouveaux miARNs (Creighton et al., 2009; Shendure and Ji, 2008).

Parmi la diversité des méthodologies présentées, seul le RNA-Seq est capable à la fois de quantifier de manière absolue l'ensemble des miARNs d'un échantillon de manière très sensible, ainsi que d'en découvrir de nouveaux (Willenbrock et al., 2009).

Tableau 4: Comparaison des caractéristiques principales des différentes méthodes de détection et de quantification des miARNs.

Méthode	Principe	Quantification	Avantages	Inconvénients	Sources
Hybridation <i>in situ</i>	Révélation à l'aide d'une sonde spécifique	Relative et semi-quantitative	Visualisation possible du patron d'expression dans les cellules et les tissus, dans un contexte spatio-temporel, préserve l'intégrité de l'ARN car la cellule n'est pas lysée	Difficile de détecter plusieurs miARNs simultanément, quantification relative, l'efficacité est dépendante de nombreux paramètres, comme la longueur et la concentration de la sonde, et les conditions d'expérimentation.	(McDougall et al., 1972)

RT qPCR	Amplification à l'aide d'amorces spécifiques	Absolute, par rapport à un contrôle interne	Sensible et spécifique, rapide, détection de plusieurs miARNs en même temps, détection des miARNs peu exprimés.	Biais de représentativité dû à l'amplification par PCR, la spécificité dépend de la qualité de l'amorce	(Schmittgen et al., 2008)
Microarray	Utilisation de sondes spécifiques	Quantification relative	Détection de la présence et de la régulation de plusieurs miARNs simultanément, à partir de plusieurs échantillons	Spécificité de la sonde, beaucoup de bruit de fond	(Duan et al., 2011; Liu et al., 2008)
RNA-Seq	Séquençage par synthèse du brin complémentaire d'ADNc	Absolute, par rapport au nombre total de séquences	Très sensible, découverte de nouveaux miARNs, rapide, pas de bruit de fond	Coûteux comparé aux autres techniques, souvent biais de représentativité dû à l'amplification par PCR	(Creighton et al., 2009)
PCR digitale en goutte	Répartition en 1 molécule par goutte, concentration de départ calculée par la loi de Poisson	Quantification absolue	Très sensible et spécifique, quantification absolue sans gène de référence, reproductibilité robuste	Actuellement moins disponible que la RT qPCR	(Hindson et al., 2011)

Sources : (Hindson et al., 2013; de Planell-Saguer and Rodicio, 2013).

1.3.2. Le RNA-Seq, une méthode de quantification très sensible, et de découverte de nouveaux miARNs.

Le séquençage avec la méthode Sanger s'est révélé extrêmement utile et a permis de séquencer beaucoup de génomes, et en particulier le génome humain dans le projet *Human Genome Project* (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Cependant, la technologie était longue et coûteuse, c'est pourquoi de nouvelles ont été développées et ont été appelées *Next-Generation Sequencing* (NGS) (Chi, 2008).

Plusieurs technologies de NGS ont été créées en parallèle, et chacune propose une chimie différente (voir les excellentes revues suivantes : (Branton et al., 2008; Metzker, 2010; Pareek et al., 2011)), en revanche la logique reste la même chez tous les concurrents : une étape de fragmentation des acides nucléiques (lorsque les fragments sont longs) est suivie de différentes étapes de ligation à des amorces, et d'amplification, puis de séquençage par synthèse de brins d'ADN. Les millions de séquences obtenues, d'une

longueur comprise entre 35 et 400pb sont ensuite alignées sur le génome ou le transcriptome de référence, puis analysées par des méthodes bioinformatiques. L'ensemble des techniques de NGS vise à comprendre la structure et la fonction du génome (Figure 14).

Les techniques de séquençage de l'ARN (RNA-Seq) font partie des technologies de NGS, et permettent de séquencer et quantifier le transcriptome des cellules, incluant les ARNm et les ARNs non codants (Wang et al., 2009b). Il existe plusieurs méthodologies différentes (dont les principales sont Illumina IG, Applied Biosystems SOLID, Roche 454 Life Science, Helicos Biosciences) mais toutes suivent le même principe : la population d'ARN, totale ou fragmentée pour les longs transcrits, est souvent convertie en ADN complémentaire (ADNc) avec des adaptateurs à l'une ou sur les deux extrémités. Ensuite, chaque fragment d'ADNc est séquençé (suivant ou non une étape d'amplification de la librairie) à partir de l'une ou des deux extrémités (*single strand* ou *pair-end sequencing*). La longueur des fragments qui peuvent être séquençés est de 30-400pb selon la technologie utilisée. Enfin, les lectures de séquences obtenues (*reads*) sont alignées sur un génome ou transcriptome de référence, ou bien assemblées *de novo* pour produire la carte de référence. Finalement, les résultats obtenus par RNA-Seq sont validés et comptés en analyse de transcrits par des méthodes de bioinformatique (Wang et al., 2009b).

Ainsi, aujourd'hui, les technologies de RNA-Seq sont devenues abordables financièrement pour les laboratoires, et permettent une quantification absolue et très sensible, ainsi que la découverte de nouveaux miARNs dans les échantillons d'intérêt. Dans ce travail de thèse, la technologie d'Illumina a été employée pour réaliser du séquençage d'ARNm et de miARNs, et le principe de cette technologie est décrit sur la Figure 15.

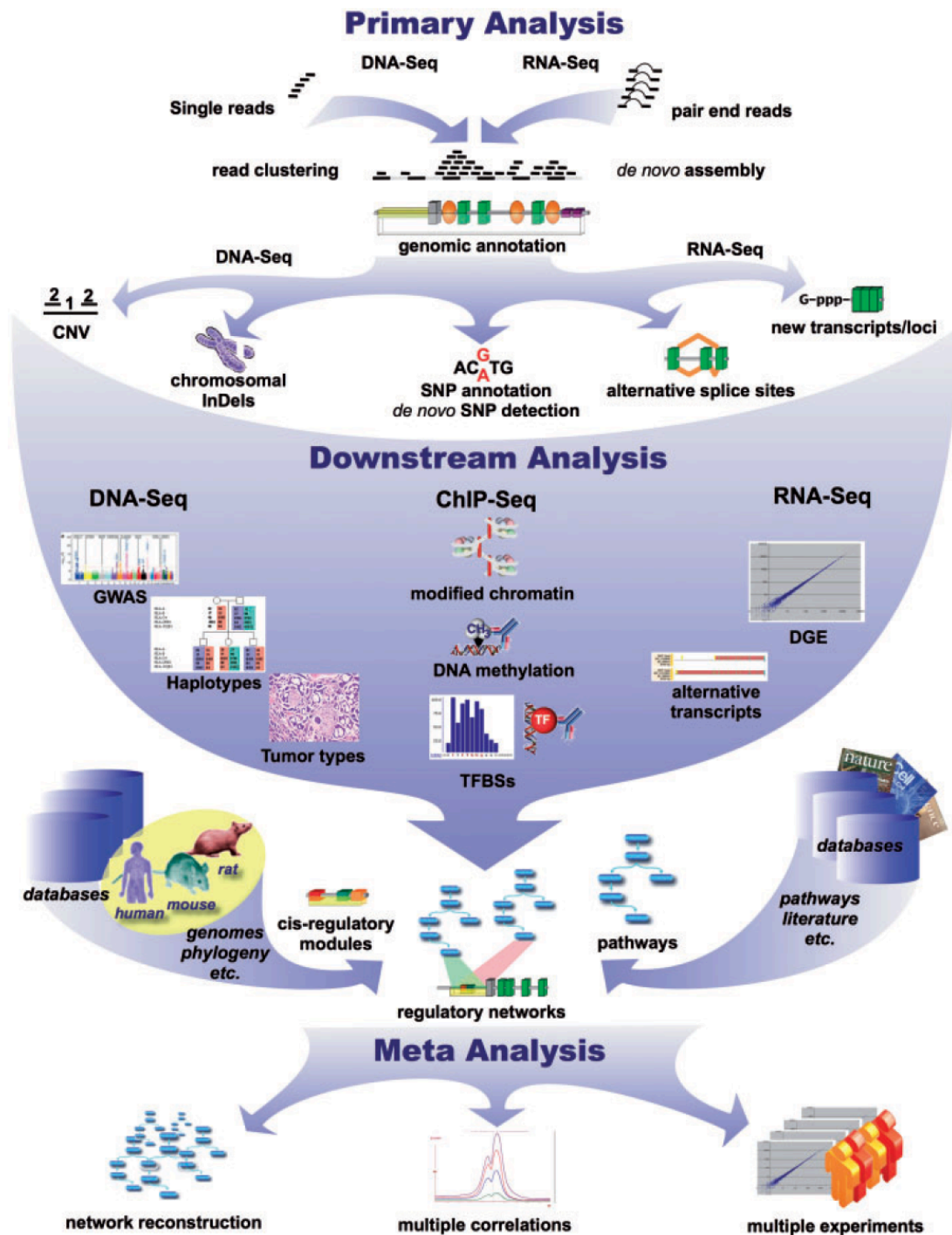


Figure 14: Représentation générale de l'intérêt des techniques de NGS.

Les analyses primaires correspondent aux analyses basées directement sur la comparaison de l'ensemble des séquences obtenues par séquençage. Cela permet de déterminer le nombre de copies d'un gène (*copy number variation* : CNV), des insertions, translocations et délétions de parties de chromosomes (InDels pour *insertion and deletion*), la détection de mutation à l'échelle du nucléotide (SNP pour *single nucleotide polymorphism*), ou encore la découverte de sites d'épissages alternatifs ou de nouveaux transcrits. Les analyses secondaires (*downstream analysis*) se répartissent en 3 catégories : le séquençage d'ADN (*DNA-Seq*) correspond au re-séquençage du génome réalisé en partie dans les

études de GWAS (*genome-wide-association-studies*), pour définir des haplotypes ou des mutations dans les cellules tumorales. Les techniques de ChIP-Seq (*Chromatin immunoprecipitation sequencing*) déterminent la structure de la chromatine, comme la méthylation et l'acétylation des histones, pour définir les régions accessibles aux facteurs de transcription (TFBS pour *transcription factor binding site*). Le séquençage d'ARN (*RNA-Seq*) permet de déterminer l'expression des transcrits connus et nouveaux (DGE : *differential gene expression*), ainsi que des variants d'épissage. L'ensemble de ces 3 stratégies converge vers l'identification de voies de signalisation et de réseaux de régulation biologiques. **Les méta-analyses** permettent de combiner les résultats issus de différentes technologies (NGS, protéomique, métabolomique) pour reconstruire et définir une description globale des phénomènes biologiques. Source : (Werner, 2010).

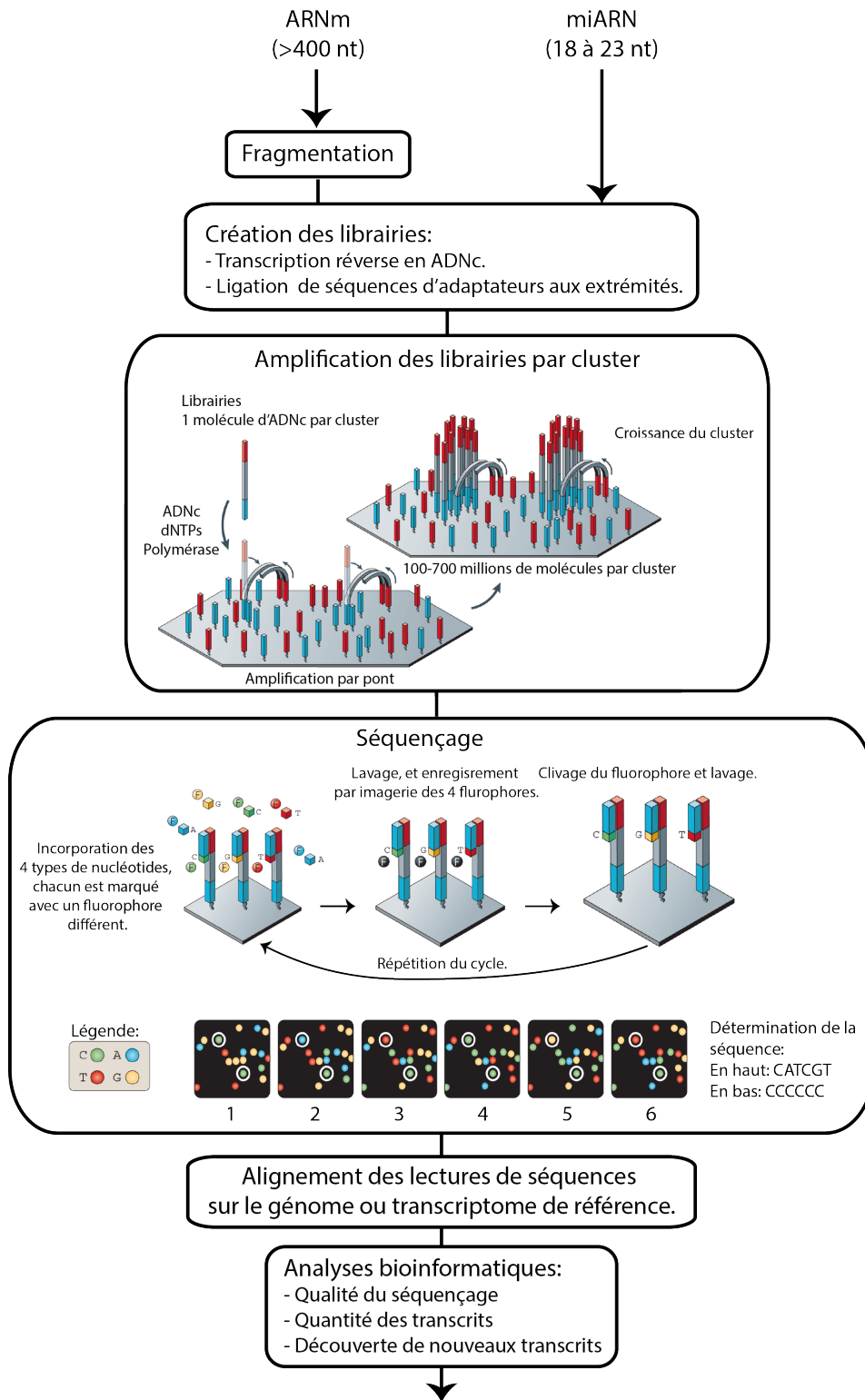


Figure 15: Comparaison des grandes étapes du RNA-Seq pour l'ARNm et les miARNs avec la technologie Illumina.

La préparation des bibliothèques d'ARNm démarre par une fragmentation de l'ARN, car la taille des ARNm est supérieure à celle qui peut être séquencée (400 nt). L'ARN est ensuite réverse transcrit en ADNc, et des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités. Ces adaptateurs vont permettre l'immobilisation des ADNc sur un support, afin de réaliser l'amplification avec la technique des

ponts. Les brins d'ADNc sont ensuite dénaturés. Le séquençage se réalise par la synthèse du brin complémentaire de l'ADN. L'ensemble des 4 nucléotides, qui possède un fluorophore spécifique est ajouté. Après l'incorporation d'un nucléotide à chacune des séquences, la préparation est lavée, et l'émission de la fluorescence est enregistrée par imagerie. Ensuite, l'extrémité qui contient le fluorophore est clivée, puis un nouveau cycle démarre. Enfin, les séquences sont alignées au génome ou transcriptome de référence, et analysées par bioinformatique. Les schémas sont issus de : (Metzker, 2010).

1.4. A la découverte de nouveaux miRNAs.

1.4.1. Les algorithmes de prédiction pour la découverte de nouveaux miRNAs.

La découverte de nouveaux miARNs dans un échantillon à partir d'études de RNA-Seq est possible grâce à l'utilisation d'algorithmes bioinformatiques. Il en existe tout une variété : miRDeep (Friedländer et al., 2008), miRanalyzer (Hackenberg et al., 2009), miRExpress (Wang et al., 2009a), miRTools (Zhu et al., 2010), miReNA (Mathelier and Carbone, 2010), miRTrap (Hendrix et al., 2010), dont certains sont spécialement développés pour une espèce particulière, comme par exemple miRDeep-P et miRPlant (An et al., 2014) pour les plantes. L'utilisation d'un algorithme plutôt qu'un autre conditionne la sélectivité, l'efficacité et la spécificité des paramètres permettant la découverte de nouvelles espèces de miARNs.

Le programme le plus utilisé, et le plus performant dans la découverte de nouveaux miARNs d'après des études de comparaison (Williamson et al., 2013), est celui de miRDeep (Friedländer et al., 2012). Les algorithmes de ce programme sont d'ailleurs réutilisés comme composants cœur dans d'autres programmes, comme miRTools (Zhu et al., 2010), miReNA (Mathelier and Carbone, 2010) et miRPro (Shi et al., 2015).

Dans l'étude que nous avons réalisée, nous avons utilisé le programme miRPro, qui s'appuie très largement sur l'algorithme cœur de miRDeep. En conséquence, la méthode d'analyse de ces deux programmes sera décrite et comparée.

1.4.1.1. Les programmes *miRDeep* et *miRDeep2*.

L'ensemble du programme miRDeep permet de détecter la présence de séquences de miARNs, et d'en découvrir des nouveaux par prédiction. Pour cela, miRDeep s'appuie sur les caractéristiques de biogénèse des miARNs (Friedländer et al., 2008). Plus particulièrement, les algorithmes s'appuient sur la reconnaissance et la reconstruction de la forme en épingle à cheveux du précurseur, créé par le clivage du pri-miARN par l'enzyme

DROSHA (voir Chapitre 1, paragraphe 1.3.3.1). L'étape de maturation suivante, réalisée par l'enzyme DICER, génère le brin du miARN mature, le brin complémentaire au miARN mature qui est dégradé, et la séquence en forme de boucle (Figure 16). Ainsi, après l'alignement des lectures de séquences sur le génome, l'algorithme excise la région génomique qui encadre chacune des séquences lues, et les compile pour reconstruire la structure secondaire de l'ARN. Les séquences des précurseurs de miARNs plausibles sont identifiées. Ensuite, un score est attribué pour évaluer la probabilité d'occurrence de la séquence du précurseur, en combinant la stabilité de la molécule, ainsi que la position et la fréquence des lectures avec la structure secondaire du précurseur potentiel (Friedländer et al., 2008). En effet, l'algorithme aligne les lectures de séquences sur les 3 brins théoriques issus du précurseur, suite à la maturation par DICER : le brin du miARN mature, le brin du miARN passager, et la boucle. La séquence du brin mature est très généralement plus prépondérante dans la cellule que les autres séquences, elle est ainsi plus fréquemment séquencée. Cela permet de faire la distinction entre le brin mature et passager (Figure 16).

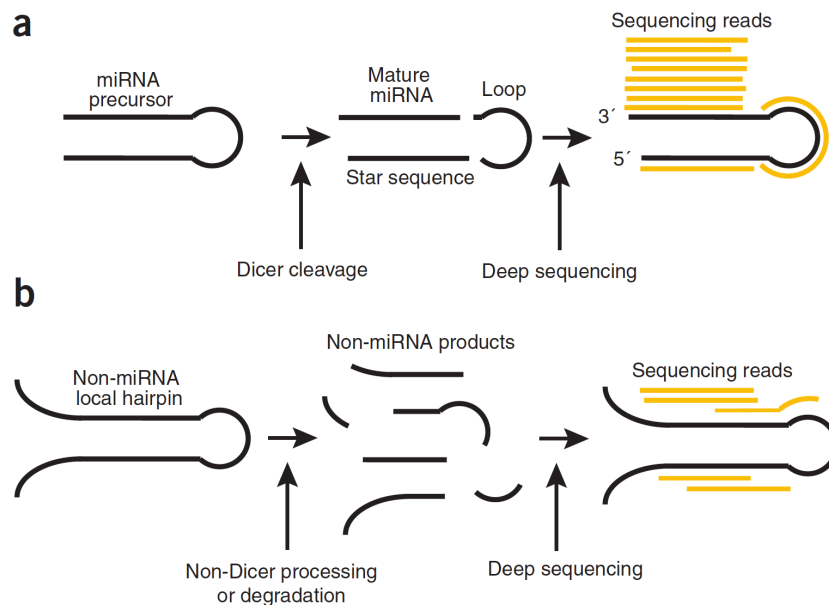


Figure 16: Représentation schématique du mode d'action de l'algorithme miRDeep dans la reconnaissance des séquences de miARNs.

A: Représentation du mode d'action de l'algorithme de miRDeep lors du séquençage d'un miARN mature. La séquence du miARN précurseur est clivée par l'enzyme DICER, ce qui génère le brin du miARN mature, le brin complémentaire au miARN mature qui est dégradé (*star sequence*), et la séquence en forme de boucle. Chacune des séquences précédentes a une certaine probabilité à être séquencée, dépendante de sa quantité dans la cellule. Lorsque miRDeep aligne les lectures de séquences sur le

génomique et sur les séquences prédites pour être des séquences de miARN précurseurs, les lectures s'alignent sur les 3 brins issus de la maturation produite par DICER. Cependant, la séquence du brin mature est très généralement plus présente dans la cellule que les autres séquences, elles sont donc aussi plus fréquemment séquencées. C'est également un moyen qui discrimine le brin du miARN mature de celui dégradé. **B : Représentation du mode d'action de l'algorithme miRDeep lorsque la séquence en épingle à cheveux ne correspond pas à un précurseur de miARN.** Les bouts de séquences obtenus à partir de structures en épingle à cheveux qui ne sont pas clivés par l'enzyme DICER ne s'alignent pas de la même manière que ceux qui correspondent à des miARNs.

Dans le but de perfectionner la spécificité et la sensibilité de reconnaissance des miARNs dans les échantillons de RNA-Seq, l'algorithme miRDeep a été amélioré, et la version supérieure nommée miRDeep2 (Friedländer et al., 2012). D'abord, pour limiter les biais apportés par les amplifications par PCR des bibliothèques avant le séquençage, l'algorithme prend en compte la provenance des séquences selon les échantillons. Il ne retient que les séquences qui sont détectées dans au moins deux échantillons indépendants, et pour cela il ajoute des étiquettes aux séquences pour tracer leur provenance.

Ensuite, plusieurs données expérimentales proposent que les miARNs fonctionnels peuvent être transcrits à partir des deux brins d'ADN génomique du gène du miARN. Ainsi, miRDeep2 analyse les deux brins de manière séparée et indépendante pour pouvoir détecter ces cas de figure.

Enfin, pour ne pas limiter le programme dans la découverte de variants potentiels de miARNs, miRDeep2 autorise quelques mésappariements entre la séquence lue et les séquences de référence.

Tout comme son prédécesseur miRDeep, miRDeep2 s'est révélé être le programme le plus populaire et le plus utilisé pour quantifier les miARNs connus, et prédire les nouveaux miARNs (Shi et al., 2015). Cependant, depuis sa mise au point, quelques désavantages ont été découverts. Ses critères de reconnaissance des nouveaux miARNs sont finalement peu sélectifs, ce qui induit un comptage excessif de lectures de séquences, entraînant un grand nombre de faux-positifs dans les analyses de quantifications différentielles sous-jacentes. De plus, l'algorithme présente un manque de souplesse pour permettre la découverte de miARNs non-canoniques. Ainsi, de nouveaux programmes ont été développés pour perfectionner les faiblesses de miRDeep2, et en particulier le programme miRPro (Shi et al., 2015).

1.4.1.2. Le programme miRPro.

Le programme miRPro se différencie de miRDeep2 car il adopte des approches différentes et plus précises pour réaliser l'excision des séquences adaptatrices, l'alignement des séquences sur le génome de référence, et sur la quantification des miARNs. Par ailleurs, l'algorithme cœur de prédiction des nouveaux miARNs repose largement sur celui de miRDeep2, mais a été perfectionné en partie pour favoriser la découverte des variants de miARNs, et de changement de brin dans la sélection du brin mature lors de phénomène d'« *arm switching* » (Griffiths-Jones et al., 2011; Meijer et al., 2014). Enfin, et ce détail est d'une importance cruciale dans l'analyse de la découverte de nouveaux miARNs, miRPro annote les séquences prédites de nouveaux miARNs de manière homogène entre tous les échantillons étudiés. Cela évite les redondances, et permet de réaliser des analyses d'expression différentielle (Shi et al., 2015). Pour l'ensemble des raisons décrites, nous avons utilisé le programme miRPro pour réaliser les analyses de RNA-Seq (Figure 17).

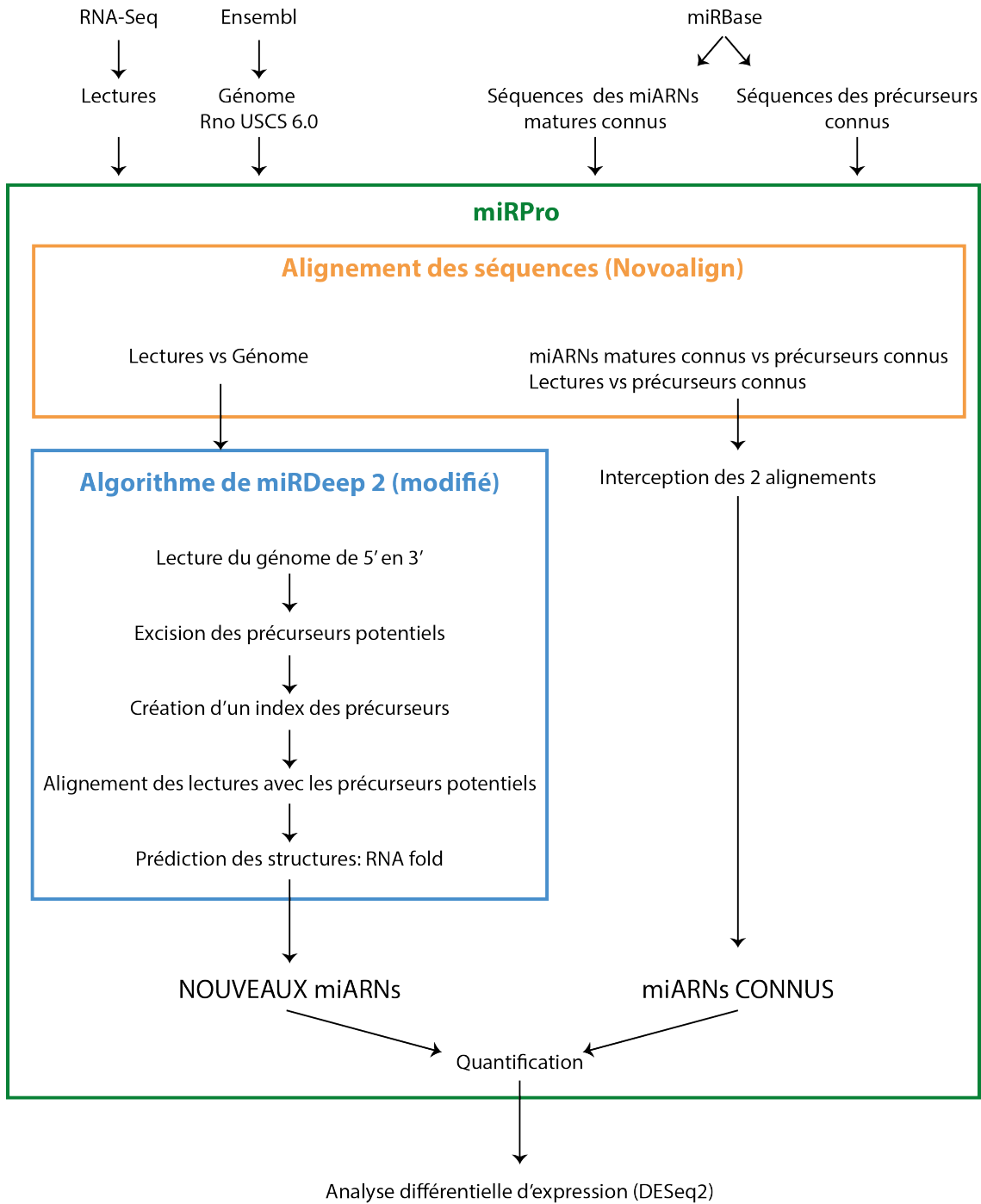


Figure 17: Représentation schématique de l'analyse bioinformatique des résultats de RNA-Seq de miARNs avec miRPro.

Les résultats de lectures de séquences issues du RNA-Seq, les séquences théoriques du génome du rat et des miARNs récupérées des bases de données sont incorporées dans le programme miRPro. La première étape du programme consiste à aligner les résultats expérimentaux du séquençage (lectures) avec les données théoriques, à l'aide de l'algorithme Novoalign. La découverte des miARNs nouveaux se réalise grâce à l'algorithme de miRDeep2, intégré dans le programme miRPro, et optimisé. Enfin, l'analyse différentielle d'expression des miARNs entre les structures a été réalisée avec un programme dédié : DESeq2.

1.4.2. Découverte de miRNAs non conventionnels grâce aux techniques de RNA-Seq : les isomiRs.

Depuis l'accès aux techniques de RNA-Seq, des variants de miARNs ont été observés (Landgraf et al., 2007). Ils présentent plusieurs longueurs et/ou des séquences différentes d'un même miARN dont la séquence est référencée sur miRBase, et ont été nommés isomiRs (Guo and Chen, 2014; Neilsen et al., 2012; Tan and Dibb, 2015).

Un gène de miARN peut donner naissance à plusieurs isomiRs distincts. En effet, dans la biogénèse canonique, les extrémités 5' et 3' du miARN sont déterminées par les clivages successifs des ribonucléases DROSHA et DICER. Ainsi, des clivages imprécis de la part de ces deux enzymes peuvent survenir, et produire des variants du même miARN de longueur hétérogène. Aussi, il peut se produire, de manière post-transcriptionnelle, des additions de bases supplémentaires (Neilsen et al., 2012).

Les isomiRs sont classés en 3 groupes, selon la variation observée comparée au miARN mature (Neilsen et al., 2012):

- Les **3' isomiRs**, dont la modification apparaît en 3' du miARN. C'est la catégorie la plus représentée à la fois chez les plantes et les animaux. La région « *seed* » du miARN reste inchangée, ainsi souvent l'isomiR s'hybride aux mêmes cibles que le miARN conventionnel (Guo and Chen, 2014; Neilsen et al., 2012; Tan and Dibb, 2015).
- Les **5' isomiRs**, dont la modification apparaît en 5' du miARN. Cette catégorie est plus rare. La région « *seed* » peut être modifiée par décalage des nucléotides, ainsi l'isomiR ne régule plus les mêmes cibles que le miARN conventionnel (Guo and Chen, 2014; Neilsen et al., 2012; Tan and Dibb, 2015).
- Les **isomiRs polymorphiques**, qui présentent des variations au milieu de la séquence du miARN.

Les classes d'isomiRs 5' et 3' sont elles-mêmes divisées en sous-classes : « *templated* » ou « *non-templated* », signifiant que la variation modifie (« *non-templated* ») ou non (« *templated* ») la séquence canonique du miARN référencée dans miRBase (Figure 18).

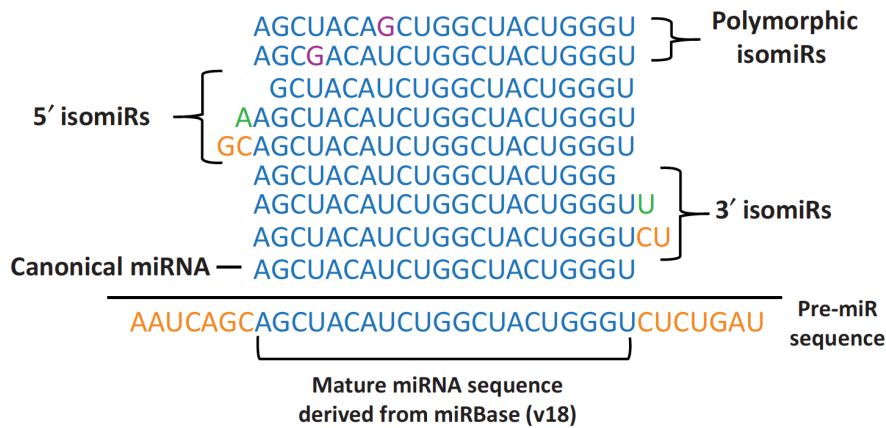


Figure 18: Représentation des différentes classes d'isomiRs.

Cette figure représente les différents isomiRs du miR-222 humain. Les séquences sont répertoriées sur miRBase. La séquence canonique de miR-222 est représentée en bleu. Les modifications de séquences présentées en orange représentent les modifications « *templated* », alors que celles représentées en vert représentent les variations « *non-templated* ». Dans la catégorie des isomiRs polymorphiques, les nucléotides en violet sont ceux qui sont différents de ceux de la séquence mature. Source : (Nielsen et al., 2012).

L'expression des isomiRs est conservée entre les espèces (Guo et al., 2013), varie en fonction du *stimulus* biologique appliqué (Newman et al., 2011; Wyman et al., 2011), et est différente selon les lignées cellulaires et les tissus étudiés (Bar et al., 2008; Li et al., 2012b; Voellenkle et al., 2012), signifiant que leur biogénèse est à la fois dynamique et modulable. Par ailleurs, il a été démontré que les isomiRs ont un intérêt biologique pertinent. En effet, ils sont capables d'être incorporés dans des protéines AGO, et en particulier AGO1 et 2, et de réprimer leur cible (Tan et al., 2014).

La découverte des isomiRs enrichie et complexifie la compréhension du monde des miARNs, et leur prise en compte va permettre de mieux comprendre la biologie des miARNs et leurs impacts sur les fonctions cellulaires.

1.5. Les miARNs participent à définir les spécificités des différentes structures du SNC.

1.5.1. Le SNC exprime des miARNs particuliers.

Des études utilisant les techniques de *microarray* et de *Northern blot* pour évaluer le niveau d'expression des miARNs dans plusieurs organes ont montré que certains miARNs sont spécifiques ou enrichis dans le SNC. En particulier, l'étude de Sempere et de ses collaborateurs montre par *Northern blot* que 7 miARNs sont très enrichis dans le cerveau comparé aux autres organes étudiés : miR-9, -124a, -124b, -135, -153, -183, -219, alors que d'autres y sont enrichis : miR-9*, -125a, -125b, -128, -132, -137, -139 (Sempere et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés par une approche de *microarray* (Babak et al., 2004). Une troisième étude démontre, également par une technique de *microarray*, que 5 miARNs sont spécifiques ou enrichis dans le cerveau en comparaison avec le foie, le thymus, les testicules et le placenta : miR-9, -124a, -128a, -128b, -129 (Barad et al., 2004). De la même façon, Thomson et ses collaborateurs ont étudié la différence d'expression de miARNs par *microarray* entre différents organes : le foie, le cœur, le cerveau et le thymus, et montrent que les miARNs enrichis dans le cerveau ne sont pas les mêmes suivant le stade de développement. Dans un cerveau jeune les miARNs enrichis sont les suivants: miR-154, -136, -9, -124a, -127, alors que dans un cerveau adulte, se sont miR-222, miR-125b, miR-125a (Thomson et al., 2004). L'ensemble de ces résultats est confirmé lors d'une étude qui compare un grand nombre de tissus entre eux, et qui révèle que les miR-138, -124a, -128, -9, 132 et -338 sont enrichis dans le cerveau (Baskerville and Bartel, 2005).

De manière très intéressante, les miR-124 et -9, dont l'expression est très enrichie dans le cerveau, jouent un rôle dans la spécification des caractères neuronaux des cellules. Plus particulièrement, un plasmide qui code à la fois pour les miR-9, le miR-9* (les deux brins du miR-9 ont été précédemment montrés comme étant enrichis dans le cerveau) et le miR-124, a été transfecté dans des cellules de fibroblastes humaines, avec un facteur de transcription neuronal NEUROD2. Cette combinaison entraîne la différenciation des fibroblastes en cellules neuronales. Ces dernières arrêtent de se diviser, expriment des marqueurs typiquement neuronaux, comme la synapsine 1 ou des récepteurs NMDA. Par ailleurs, les cellules présentent un potentiel de membrane inférieur comparé aux fibroblastes, et sont sensibles aux variations de courant. De manière importante, l'ajout seul de NEUROD2 n'entraîne pas de différenciation des fibroblastes en neurones, mais favorise

leur transformation en cellules neuronales. La différenciation des fibroblastes en cellules neuronales semble être réalisée en partie par un remodelage de la chromatine et l'activation de plusieurs gènes conservés dans l'évolution, et impliqués dans les programmes de développement des neurones (Yoo et al., 2011a). Cette démonstration témoigne de l'importance du rôle joué par les miARNs dans la détermination des caractères particuliers associés à un type cellulaire.

1.5.2. Certains miARNs sont spécifiques de régions du SNC.

Le SNC est subdivisé en plusieurs régions qui se démarquent par leur morphologie, leurs fonction et rôle, et leur phénotype. Quelques travaux ont cherché à savoir si ces différences pouvaient être expliquées en partie par l'expression différentielle de certaines espèces de miARNs. Trois études majeures répondent à cette problématique : les deux premières sont réalisées chez la souris (Bak et al., 2008; Juhila et al., 2011), alors que la troisième est réalisée chez le rat (Olsen et al., 2009). Le travail de Bak et de ses collaborateurs compare l'expression des miARNs entre le bulbe olfactif, l'œil, le cervelet, la moelle épinière, la glande pituitaire (ou hypophyse), le bulbe rachidien, l'hypothalamus et le cortex. Le travail de Juhila et de ses collaborateurs compare le miRNome entre le cortex préfrontal et l'hippocampe. Enfin, l'étude menée par Olsen et ses collaborateurs chez le rat compare le miRNome entre le cervelet, l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus et la substance noire. Les résultats de ces travaux démontrent que certains miARNs sont spécifiquement plus ou moins enrichis ou déplétés dans certaines des structures. Une synthèse des résultats est présentée dans la Figure 19.

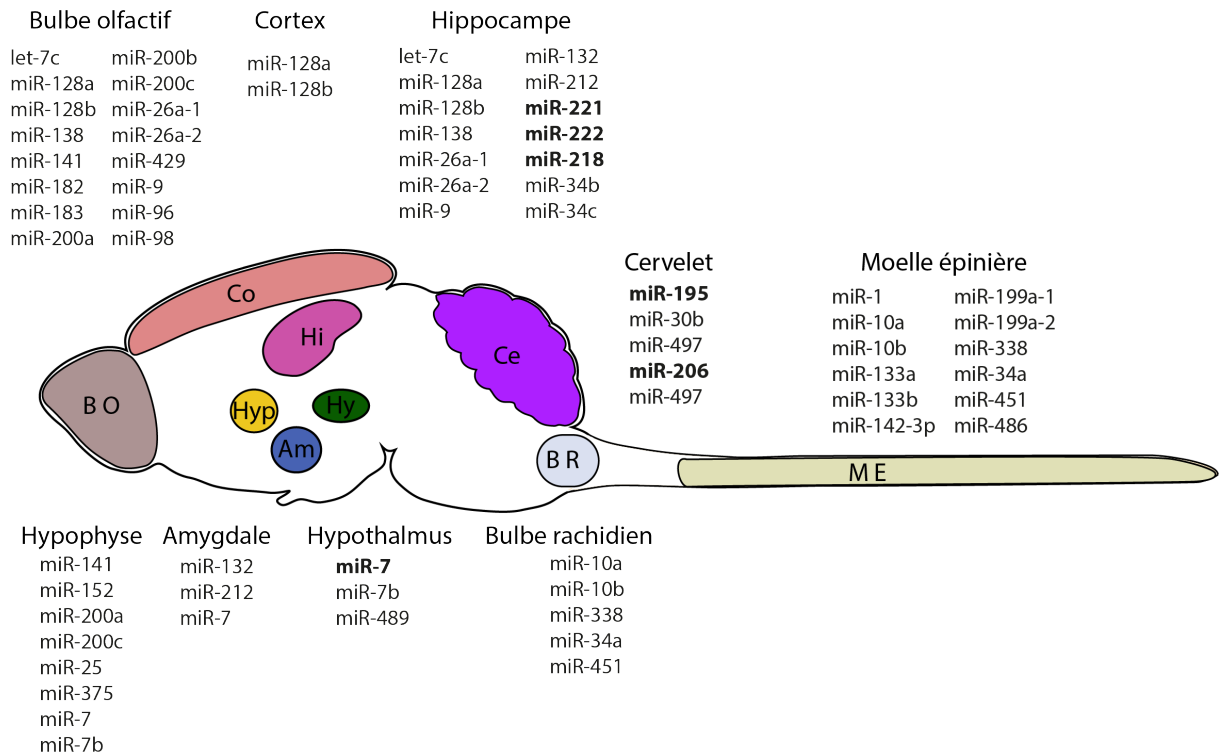


Figure 19: Synthèse schématique du miRNome spécifique par structure du SNC chez le rongeur.

Le schéma résume les résultats des 3 études suivantes : (Bak et al., 2008; Juhila et al., 2011; Olsen et al., 2009). Chacune de ces études ne s'intéresse pas aux mêmes structures, mais, lorsque c'est le cas, les miARNs représentés en gras sont ceux qui sont trouvés dans au moins deux études. La signification des abréviations est la suivante : Am : amygdale ; B O : bulbe olfactif ; Ce : cervelet ; Co : cortex ; Hi : hippocampe ; Hy : hypothalamus ; M E : moelle épinière ; B R : bulbe rachidien ; Hyp : hypophyse.

Deux autres études se sont aussi attachées à décrypter le rôle du miRNome dans le SNC. Yao et ses collaborateurs s'intéressent à l'évolution du miRNome au cours du développement du rat dans le cortex (Yao et al., 2012), et Shinohara et ses collaborateurs comparent le profil de miARNs dans la sous-structure CA3 de l'hippocampe comparé à l'hippocampe en entier chez le rat (Shinohara et al., 2011). Ces deux études montrent également une expression différentielle de certains miARNs.

1.6. Problématique de l'étude.

Dans le SNC, les miARNs sont largement impliqués dans les processus de développement, de spécification du type cellulaire, et de régulation de la plasticité neuronale. Ils sont donc cruciaux dans la physiologie du SNC.

Pour continuer de caractériser le rôle des miARNs dans le SNC, il est indispensable de connaître leur spectre d'expression dans les différentes régions. Chez le rat, un modèle d'étude très utilisé dans le domaine des neurosciences, le nombre de miARNs référencés dans la base de référence miRBase est deux fois inférieur à celui des miARNs découverts chez l'Homme et la souris. Cette observation laisse penser qu'un grand nombre de miARNs ne sont pas encore caractérisés chez le rat.

Nous nous sommes demandés si les miARNs étaient importants dans la spécification transcriptomique des structures du SNC chez le rat. Pour y répondre, nous avons caractérisé le miRNome de 5 structures importantes du SNC en condition physiologique chez le rat adulte : le cortex, l'hippocampe, le striatum, le bulbe olfactif et la moelle épinière, à l'aide de RNA-Seq.

2. Manuscrit 2 : RNA-Seq reveals novel miRNAs shaping the transcriptomic identity of rat brain structure.

L'objet de ce travail est de caractériser la signature en miARNs de 5 grandes structures du SNC du rat en condition physiologique : le cortex, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le striatum et la moelle épinière, Pour cela, nous avons appliqué la technologie de RNA-Seq pour étudier l'expression des miARNs connus et nouveaux, à partir d'échantillons de tissus de 3 rats adultes.

Notre travail montre qu'il existe une expression différentielle des miARNs entre les 5 structures, suggérant leur implication dans la détermination de la spécification transcriptomique et fonctionnelle des structures du SNC. De plus, nous mettons en exergue la présence de nouvelles espèces de miARNs.

En perspectives, nous cherchons à valider par d'autres techniques l'expression des nouveaux miARNs, et à caractériser leur rôle physiologique. D'autre part, nous souhaitons évaluer le rôle joué par les miARNs dans la spécification tissulaire des régions du SNC.

Pour conclure, cette étude renforce les démonstrations de l'importance jouée par les miARNs dans la physiologie du SNC.

Dans cette étude, j'ai réalisé l'extraction et la quantification des ARNs, et les bibliothèques d'ADNc qui ont été envoyées sur la plateforme de séquençage pour effectuer le séquençage. J'ai participé aux prises de décisions dans l'analyse bioinformatique des résultats, et réalisé les expérimentations de RT qPCR de validation des miARNs identifiés. Enfin, j'ai activement participé à l'écriture du manuscrit.

Small RNA-Seq reveals novel miRNAs shaping the transcriptomic identity of rat brain structures

Anaïs Soula^{1,2}, Mélissa Valere^{1,2}, Maria-Jose Lopez-Gonzalez^{1,2}, Alexis Groppi^{3,4}, Marc Landry^{1,2}, Macha Nikolski^{3,4}, Alexandre Favereaux^{1,2}

1: University of Bordeaux, Bordeaux, France.

2: CNRS, UMR 5297, Interdisciplinary Institute of Neuroscience, Bordeaux, France.

3: Univ. Bordeaux, CBiB, F-33000 Bordeaux, France.

4: Univ. Bordeaux, CNRS / LaBRI, F33405 Talence, France.

Keywords:

central nervous system/ miRNA/ miRNome/RNA-Seq

Abstract

In the central nervous system (CNS), the microRNAs (miRNAs), small endogenous RNAs exerting a negative post-transcriptional regulation on mRNA, are involved in major functions, such as neurogenesis, and synaptic plasticity. Moreover, they are essential to define the specific transcriptome of the tissues and cell types. However, few studies were performed to determine the miRNome of the different structures of the rat CNS, even though rat is a major model in neuroscience. Here, we determined the miRNome of the hippocampus, the cortex, the striatum, the spinal cord and the olfactory bulb, by small RNA-Seq. Then, we correlated miRNAs expression with their mRNA targets by RT-qPCR. We found a total of 365 known miRNAs and 90 novel miRNAs expressed in the CNS of the rat. Each structure expressed a particular miRNome, and the novel miRNAs seemed to be important in defining structure-specific miRNomes. Differential analysis showed that several miRNAs were specifically enriched/depleted in these CNS structures. Finally, we correlated enriched/depleted miRNA expression with the expression of their mRNA targets and confirmed some of these correlations by RT-qPCR. Altogether, these results suggest the critical role played by these enriched/depleted miRNAs in the transcriptomic and functional identities of CNS structures.

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) comprise one of the most abundant classes of gene regulatory molecules in the organism. They are small (22 nt) endogenous non-coding RNAs operating a negative translational regulation on messenger RNAs (mRNAs) (Bartel, 2004). miRNAs are involved in the regulation of the majority of signaling pathways, both in physiology and pathology, in a broad range of organisms from viruses to animals (Carrington & Ambros, 2003). Their biogenesis mostly starts by the transcription of the miRNA gene by RNA pol II, generating an imperfect stem-loop structure, called the pri-miRNA (Bartel, 2004; Cai *et al*, 2004; Lee *et al*, 2004). The pri-miRNA is further processed several times and transported into the cytoplasm. Briefly, the enzyme Drosha cleaves the single stranded primary miRNA transcripts to produce a stem-loop secondary structure : the pre-miRNA. Then, the pre-miRNA is cleaved by the enzyme Dicer to produce a mature miRNA duplex (Bernstein *et al*, 2001). Finally, one of the two strands of the mature miRNA duplex, called the guide strand, is incorporated into a proteic complex called the RISC complex. From this point, this miRNA-RISC complex, referred as the miRISC, will exert a translation inhibition on target mRNA (Lee *et al*, 2002). The target recognition by the miRNA is mainly based on a Watson-Crick pairing between a specific region of the miRNA called the seed region (nucleotides two to eight), and a complementary sequence on the 3'UTR of the target mRNA (Bartel, 2009; Wang, 2014). In addition to the seed region binding, the remainder of the miRNA can be engaged in an imperfect or perfect base-pairing with the target mRNA, resulting respectively in translational inhibition and/or degradation of the target mRNAs. Eventually, both interaction modes induce a decrease of target mRNA translation into protein. Because of the imperfect binding between miRNAs and target mRNAs, miRNAs are able to precisely regulate the expression of dozens, if not hundreds, of genes. Indeed, a single miRNA can bind to numerous different mRNAs, while a single mRNA

can present binding sites for multiple miRNA species (Friedman *et al*, 2009). Consequently, miRNAs are considered as key players in the regulation of cellular gene expression.

The importance of miRNAs in the regulation of the main brain functions is now well established. Thus, miRNAs are involved in many important physiological processes, such as the development and the maturation of the nervous system (Díaz *et al*, 2014), synaptic plasticity, learning and memory (Rajman *et al*, 2017; Aksoy-Aksel *et al*, 2014; Letellier *et al*, 2014; Bredy *et al*, 2011). In addition, miRNAs are involved in numerous neurodegenerative diseases, such as Alzheimer (Sarkar *et al*, 2016), Parkinson, Huntington and amyotrophic lateral sclerosis (Tan *et al*, 2015; Maciotta *et al*, 2013; Nelson *et al*, 2008).

For example, the role of two brain-specific miRNAs, miR-134 and miR-124, has been well described. miR-134 regulates the size of dendritic spines in rat hippocampal neurons by the translational repression of the Lim-domain containing protein kinase 1 (LimK1), an activator of actin polymerization (Schratt *et al*, 2006; Bernard, 2007). Thus, miR-134 regulates the morphology of most excitatory synapses with an impact on synaptic plasticity dependent functions such as long-term potentiation and memory formation (Gao *et al*, 2010). miR-124, another brain-specific miRNA, plays a critical role in the transition of progenitor neuronal cells to adult neurons, by inhibiting signaling pathways of non-neuronal genes, and thereby facilitating the expression of the neuronal transcriptomic identity (Conaco *et al*, 2006; Makeyev *et al*, 2007).

Interestingly, miRNAs show different roles depending on the region where they are expressed. For example, miRNAs are particularly studied in the striatum in the context of the addiction to drugs or alcohol (Bali & Kenny, 2013), because this region serves as a key area for habit learning, one of the major mechanisms for addiction behavior (Volkow *et al*,

2006). In particular, a recent work shows that in addiction-prone rats, striatal miRNA expression levels change in a spatially and temporally defined manner according to addiction stage. More specifically, they demonstrated that as the addiction cycle progresses, the expression of miR-101b, miR-137, miR-212 and miR-132 tends to increase. They suggest that these changes may produce deficits in plasticity, in turn promoting habitual drug seeking (Quinn *et al*, 2017). In the spinal cord, miRNAs are mainly studied in a context of spinal cord injury and pain (Favereaux *et al*, 2011; Elramah *et al*, 2014; López-González *et al*, 2017). In the olfactory bulb, where the regeneration of neurons occurs frequently, the role of miRNAs in neurogenesis mechanisms has been particularly studied. It has been demonstrated that miR-132 plays a critical role to form the basis of a structural plasticity program (Pathania *et al*, 2012). Another work shows that miR-124 target genes are involved in morphogenesis and neuron differentiation in the olfactory bulb (Li & Ling, 2017).

However, analysis of miRBase (<http://www.mirbase.org>), the most common database referencing miRNAs, shows a large difference between the number of miRNAs referenced in mouse (*mus musculus*, 1915 mature miRNAs and 1193 precursors), human (*homo sapiens*, 2558 mature miRNAs and 1881 precursors) and in rat (*rattus norvegicus*, 765 mature miRNAs and 495 precursors). Thus, it seems that a large percentage of the miRNAs expressed in the rat are not yet uncovered. Rat is a gold-standard model in neuroscience and it is thus of prime importance to get an extensive knowledge of miRNA expression in the central nervous system (CNS).

In this study, we used the small RNA-Seq technology to perform an exhaustive analysis of the miRNome of rat CNS. Even if previous studies explored the miRNome of the rat brain, either they focused their attention on one specific structure, such as the hippocampus

(Shinohara *et al*, 2011), and the hypothalamus (Amar *et al*, 2012), or they analyzed the miRNome of a structure over different developmental stages (Yin *et al*, 2015; Yao *et al*, 2012). A more extensive study has been performed on five different regions of the brain, but unfortunately using the microarray technology which limits the number of miRNAs quantified and occludes the discovery of novel miRNAs (Olsen *et al*, 2009). To our knowledge, an extensive analysis of the miRNome of several structures of rat CNS has never been performed.

We focused our attention on the olfactory bulb, the cortex, the hippocampus, the striatum and the spinal cord and found that, out of the 495 miRNAs referenced in miRBase, 365 are expressed in these five CNS structures. In addition, we discovered nearly a hundred of novel miRNAs, some of them having orthologous sequences in mouse or human that play crucial role in the regulation of the functions of neurons. We also showed that each CNS structure expresses a particular miRNome, and interestingly, the novel miRNAs seem to play a key role in defining structure-specific miRNomes. Then, we performed target prediction of these different miRNomes and Gene Ontology analysis of the targets to estimate the impact of these miRNomes on the transcriptomic identity of the CNS structures. Finally, as a proof of concept, we correlated the expression of some structure-enriched miRNAs with the expression of their mRNA targets.

Results

Small RNA sequencing of five structures of the central nervous system

We performed small RNA-Seq to reveal the miRNome of five structures of the CNS : the olfactory bulb, the cortex, the hippocampus, the striatum and the spinal cord. To perform a statistical analysis of the miRNome, we dissected these structures in triplicate from three male adult Wistar rats. Thus, we synthesized 15 independent libraries, that were finally pooled for sequencing. RNA sequencing performed well and we obtained a total of 454,577,868 reads from which 1,150,734 (0,3% of total) were filtered out because they were too short (size <15b). To assess the quality of the reads, we used FastQC software and all sequences were flagged as good quality (Supp. Table 1).

CNS expresses known and novel miRNAs

We first checked the number of miRNAs known and referenced in miRBase that were expressed among the five CNS structures. From the 495 miRNAs referenced in rat miRBase, 365 miRNAs were expressed in ours samples, corresponding to 73,7% of the miRBase-referenced miRNAs (Figure 1A).

To discover novel miRNAs expressed in the brain, we used the miRPro software (Shi *et al*, 2015a). Based on miRDeep2, miRPro analyzes the sequences obtained from small RNA-Seq experiments seeking for novel miRNAs using the following pipeline. First, miRPro aligns sequences of potential novel mature miRNAs on the genome. Then, the algorithm excises the corresponding potential pre-miRNAs from the genomic sequence. Finally, miRPro determines the most relevant pre-miRNA, in particular by the analysis of pre-miRNA folding with the RNAfold tool (Hofacker, 2003). miRPro analysis of the reads obtained from the five CNS structures led to the prediction of 8416 novel pre-miRNAs (Supp. Table 2). To discard potential false-predictive novel pre-miRNAs, we refined the

analysis by only conserving those expressed at least in two replicated samples from the same CNS structure, and with a minimum expression of 1 count per million (cpm). Finally, we identified 107 novel pre-miRNA (Supp. Table 3), which after miRNA processing gave 90 novel mature miRNAs (Supp. Table 4), not yet referenced in rat miRBase. The number of pre-miRNAs was higher than the number of mature miRNAs because 8 novel pre-miRNAs were duplicated in the genome. For example, novel-pre-miR-19 was present both on the chromosome 3 and 20, novel-miR-8 was present in 3 copies on the chromosome 1, and novel-miR-2 was present on the chromosome 7, 12, 15, 18 and twice on the chromosome 1 (Table 1).

The length of the novel miRNAs ranged from 18 nt to 24 nt, with a mean length of 20,59 nt which is in line with the conventional characteristics of miRNAs. To assess if these novel miRNAs display the canonical stem-loop structure of miRNAs, we checked the predictive folding of the novel pre-miRNA sequences. Figure 1B shows, as an example, the secondary structure of three novel pre-miRNAs: rno-mir-novel-42, the most expressed in our samples ; rno-mir-novel-35, a miRNA with an expression level corresponding to the average expression of all novel miRNAs and finally rno-mir-novel-23 which had the lowest expression. All these novel miRNAs display a stem-loop structure, similar to the one of prototypical miRNAs (e.g. rno-mir-124-1, Supp. Fig. 1). Thus, the predictive secondary structure of these novel pre-miRNAs is compatible with functional miRNAs.

pre-miRNA expression in the five CNS structures

Then, we compared pre-miRNA expression across the five CNS structures. Globally, all the studied structures expressed more or less the same amount of known pre-miRNAs species (from 319 for the striatum and up to 342 for the spinal cord, Figure 1C). As well, concerning novel pre-miRNAs, four out of the five CNS structures under study expressed

roughly the same amount of novel pre-miRNAs (49 for the olfactory bulb, 55 for the cortex, 53 for the hippocampus and 60 for the striatum). In contrast, the spinal cord expressed a higher number of novel pre-miRNAs compared to the other structures, with 68 novel pre-miRNAs, which is more than the half of the total number of novel pre-miRNAs discovered.

Then, we analyzed the repertoire of pre-miRNAs expressed in each CNS structure. We used a Venn diagram representation where each CNS structure is represented by a color : the cortex in red, the hippocampus in brown, the striatum in yellow, the spinal cord in green and the olfactory bulb in blue. Concerning known pre-miRNAs (Figure 1D), we noticed that the five CNS structures shared the expression of the majority of the pre-miRNAs species (289 out of 365, 79.17%). Moreover, most of these CNS structures did not have many specific pre-miRNAs : 1 for the cortex, 2 for the hippocampus, 5 for the striatum and the olfactory bulb. However, the spinal cord had 14 specific pre-miRNAs. Considering the novel pre-miRNAs (Figure 1E), we noticed that the five CNS structures did not share the expression of a large number of novel pre-miRNAs species : only 30 out of the 107 discovered (28.03%) which is significantly less than for known pre-miRNAs (Fisher's test, $p < 0.001$). Moreover, the majority of the CNS structures expressed more specific novel pre-miRNAs than specific known pre-miRNAs : 8 for the cortex, 5 for the hippocampus, 8 for the striatum, 4 for the olfactory bulb, and 19 for the spinal cord. This result suggests that these novel pre-miRNAs are more structure-specific than the already known pre-miRNAs. Together, these results indicate that the novel pre-miRNAs discovered in this study may have an important role in the transcriptomic specification of each of these CNS structures.

Finally, we combined the expression data of both known and novel pre-miRNAs in a single Venn diagram (Figure 1F). It confirmed that the vast majority of pre-miRNAs (319) were expressed in all the five CNS structures studied. However, each structure has a specific pre-miRNA repertoire, thanks, in part, to the novel pre-miRNAs.

Chromosomal repartition of pre-miRNAs

We analyzed the localization of the genes coding for the miRNAs along the 22 chromosomes of the rat genome.

First, we studied the strand of DNA molecule on which miRNAs were located. Globally, there was more miRNAs, known and novel, along the positive strand compared to the negative strand (Figure 2A). Concerning known (i.e. miRBase-referenced) miRNAs, 280 were located on the positive strand while 205 were on the negative strand. In contrast, 74 novel miRNAs were on the positive strand and 33 on the negative strand. Statistical analysis showed that the proportion of miRNAs located on the positive strand is significantly higher for novel miRNAs than known miRNAs (Fisher's exact test, $p < 0.05$).

Then, we analyzed the position of miRNAs along the rat genome. Considering rat miRNAs already referenced in miRBase, chromosomes 1, 6 and X contained the highest number of miRNAs (64, 73 and 59 respectively, Figure 2B & Supp. Table 5). Analysis of the expression of the miRBase-referenced miRNAs in the five CNS structures studied showed that chromosomes 1, 6 and X were the most contributing (37, 61 and 45 respectively, Figure 2B & Supp. Table 5).

Considering novel miRNAs, chromosomes 1, 7 and 10 contained the highest number of miRNAs (12, 8 and 15 respectively, Figure 2C & Supp. Table 5). Moreover, none of the

novel-miRNA has been discovered on the chromosome 13. A possible explanation is that all existing miRNAs on this chromosome had been already discovered, or that they were not expressed in these brain structures. At the chromosome level, there was no correlation between the number of known miRNAs and the number of newly discovered miRNAs. For example, the chromosome 6 expressed the highest number of known miRNAs, however we did not discover many novel miRNAs on this chromosome. In the same time, the chromosome 1 contained many known miRNAs but we still found a large number of novel miRNAs.

Finally, the chromosomal repartition of the miRNAs expressed in the five CNS structures combining both miRBase-referenced and novel miRNAs was similar to the one of miRBase-referenced miRNAs only. Thus, chromosomes 1, 6 and X were still the largest contributors to miRNAs expression in the CNS (49, 65 and 46 respectively, Figure 2C & Supp. Table 5). However, novel miRNAs contributed largely to the expression of miRNAs in the CNS from the chromosome 10, allowing it to become almost as enriched in CNS-expressed miRNAs as the X chromosome (52 and 60 respectively).

Considering the latter results, we hypothesized that there was a correlation between the length of a chromosome and the number of miRNA genes hosted. First, we analyzed the pre-miRNAs referenced in miRBase. For the whole rat genome, we plotted the number of miRBase-referenced miRNAs in function of the length of the chromosome (Figure 2D). Linear regression and statistical analysis showed that there was a correlation between the size of the chromosomes and the number of the miRNAs genes ($R^2 = 0.3295$, $p\text{-value} = 0.0052$), the longest was the chromosome the more it contained miRNA genes. Then, we considered the novel pre-miRNAs discovered and expressed in the five CNS structures studied (Figure 2E). Again, there was a correlation between the length of the chromosomes

and the number of the miRNAs genes ($R^2 = 0.2473$, p-value = 0.0185). Finally, we compiled miRBase-referenced and novel pre-miRNAs and analyzed the correlation between chromosome length and the number of pre-miRNAs (Figure 2F). Again, there was a correlation between the size of the chromosomes and the number of the miRNAs located along the chromosomes ($R^2 = 0.3814$, p-value 0.0022). As a conclusion, the number of miRNAs expressed by a chromosome was related to the size of the chromosome.

Genome mapping analysis of the novel pre-miRNAs revealed that most of them were located in intergenic regions : 62 (57.94%), or introns : 30 (28.04%), the rest was located in promoter-transcription start site : 10 (9.35%), transcription termination site : 10 (9.35%), exon : 1 (0.93%) or 3'UTR : 1 (0.93%) (Figure 2G).

novel mature miRNAs

Maturation of the pre-miRNA produces two miRNAs corresponding to the 5' and 3' ends of the stem of the hairpin structure. One of the miRNAs, called the “passenger” miRNA, is degraded while the other one, the “guide” or “mature” miRNA, is loaded in the miRISC complex to target mRNAs. To decipher the role of miRNAs in the transcriptomic regulation of CNS, it is thus of prime importance to analyze the expression of mature miRNAs.

First, we analyzed the nucleotidic composition of the novel miRNAs. We found that U is the most representative nucleotide in the 5' position of the novel miRNA sequences, followed by C and A (Figure 3).

Then, we wondered if, out of the 90 novel miRNAs we discovered, some were orthologs with a mouse and/or a human miRNA already referenced in miRBase. Using the software Blast, we defined as ortholog a miRNA sequence with a minimum of 95 % similarities with

a miRNA from another species. We found 12 novel rat miRNAs which were orthologs of mouse and/or human miRNAs (Table 2). More particularly, there were 5 miRNAs that are orthologs of mouse miRNAs only, while the others 7 miRNAs were orthologs of both human and mouse miRNAs. For example, novel-miR-7-5p and novel-miR-8-3p were canonical orthologs of mouse miR-344-5p and miR-344h-3p respectively, while novel-miR-14-3p was a canonical ortholog of both mouse and human miR-330-5p (Table 2).

miRNA targets are commonly predicted on the basis of a perfect complementarity between the seed region of the miRNA and the 3'UTR of the target mRNA. Thus, miRNAs sharing the same seed region often share the same targets, and are grouped as a family of miRNAs (Ambros *et al*, 2003). Thus, in addition to canonical orthologs, we searched for what we called “functional orthologs” which are miRNAs sharing, at least, the same seed region with a miRNA from another species.

We found in total 23 “functional orthologs” either of human or mouse miRNAs : 8 “functional orthologs” of mouse miRNAs, 12 “functional orthologs” of human miRNAs, and three novel rat miRNAs sharing seed region with both mouse and human miRNAs (Table 3). For example, novel-miR-78-5p was a “functional ortholog” of mouse miR-3070-5p, novel-miR-73-3p was a “functional ortholog” of human miR-765, and novel-miR-84-5p was a “functional ortholog” of both human and mouse miR-134-3p.

In conclusion, among the 90 novel mature miRNAs discovered in the rat CNS by small RNA-Seq, only 35 were orthologs, either classical or “functional” orthologs, of mouse or human miRNAs. Consequently, the majority of the novel miRNAs that we discovered are totally new, with no orthologs at least in mouse or human.

Clustering of the CNS structures in regard to their miRNome

To test if miRNA expression discriminated the different brain structures, we performed a heatmap analysis of the miRNome of the five CNS structures tested.

miRbase-referenced miRNAs

First, we analyzed the expression of miRBase-referenced miRNAs in the five CNS structures studied. Heatmap representation of the expression of known miRNAs in our samples showed that these 365 miRNAs enabled a near-perfect clusterization of the different CNS structures (Figure 4A). Thus, except one cortex sample which was not clustered with the two others biological replicates, all other biological replicates were grouped together. Particularly, we can notice that most of the miRBase-referenced miRNAs were expressed approximately at the same level across the different samples, and this is in line with the Venn diagramm analysis. However, specific miRNAs were differentially expressed, giving a miRNA signature for each CNS structure. For instance, the high expression level of miR-96-5p, -200a-3p, -200b-3p and -200c-3p in the olfactory bulb discriminated this structure from the others.

novel miRNAs

Then, we did the same analysis on the newly discovered miRNAs. This second heatmap showed a perfect clustering of the samples in regard to the structure considered (Figure 4B). This perfect clustering was the result of the enrichment of some structure for specific miRNAs. For example, novel-miR-47-5p had a low expression in all structures except in the olfactory bulb. The other way around, the low expression of some miRNAs enabled the clustering of a given CNS structure. For instance, novel-miR-28-3p, was well expressed in all structures but the cortex. These results suggest that the novel miRNAs discovered could be important to the specification of the CNS structures.

miRBase-referenced and novel miRNAs

Finally, we did a clustering analysis combining both miRBase-referenced and novel miRNAs. This last heatmap showed a nearly-perfect clustering of the CNS structures, still the cortex sample number three was not grouped with other cortex replicates (Figure 4C). However, the clustering coefficient is better than without the novel miRNAs suggesting the important role played by miRNAs, and in particular by the newly discovered miRNAs, in the specification of CNS structures.

miRNAs are differentially expressed in CNS structures

Heatmap clustering analysis showed that we could use the expression of miRNAs as a criterion for CNS structures classification. To clearly identify which miRNAs were specifying CNS structures, we performed a statistical analysis of miRNA expression data with the DESeq2 algorithm. Thus, we were able to determine miRNAs that were under- or over-expressed in a CNS structure compared to the others.

We found differentially-expressed miRNAs in each structure but in variable amount. A complete list of all differentially-expressed miRNAs, their fold-change to the other CNS structures and statistical p-value can be found in Supp. Table 6. In particular, the olfactory bulb had the highest number of differentially-expressed miRNAs with 44 over-expressed and 34 down-regulated (Figure 5A). In the spinal cord, there was 32 over-expressed miRNAs and 33 down-regulated (Figure 5E). Four miRNAs were over-expressed in the cortex and 7 down-regulated (Figure 5B). In the hippocampus, only two miRNAs were differentially expressed, one up- and one down-regulated (Figure 5C). Finally, in the striatum we found 20 miRNAs over-expressed and two under-expressed (Figure 5D).

Interestingly, among the differentially-expressed miRNAs, some were newly discovered miRNAs. For instance, in the olfactory bulb, novel-miRNAs rno-novel-miR-47-5p and -56-5p were up-regulated while rno-novel-miR-42-5p and -59-3p were down-regulated. In total, 9 out of the 90 newly discovered miRNAs were differentially-expressed in CNS structures. These results suggest that the expression of some miRNAs may regulate specifically gene expression in a given structure.

Specific miRNAs and their role for the physiology of the structure

To evaluate if specific miRNAs could modulate gene expression in a CNS structure, we first searched for enriched miRNAs. In addition to the statistical criterion used to define differentially-expressed miRNAs, we used a second criterion for enrichment. Indeed, we selected as specifically-enriched miRNAs, whose with a log 2 of the fold-change greater than 2, meaning that the expression of the given miRNA was at least four times higher in this structure than any other structures.

Enrichment/depletion analysis of the CNS miRNome showed that all structures had specific miRNAs. In particular, there was many miRNAs enriched in the olfactory bulb (17) and in the spinal cord (12) but only one in the striatum and none in the cortex and the hippocampus (Figure 6). Concerning down-regulated miRNAs, six miRNAs were depleted in the spinal cord but only one in the olfactory bulb, the cortex and the hippocampus, and none in the striatum. Interestingly, the only specific miRNAs of the cortex and the striatum were novel miRNAs, rno-novel-miR-28-3p and -26-3p, respectively. In addition out of the 7 specifically-depleted miRNAs in the spinal cord, 3 were novel miRNAs (Figure 6).

In order to evaluate the physiological implication of these specific miRNAs for each structure, we searched their predictive mRNA targets. Thanks to Targetscan and miRDB

tools, we predicted the targets of all enriched/depleted miRNAs for each CNS structure. Then, we compiled the top 50 predicted targets for each specific miRNA of a given structure. Finally, we performed a meta-analysis of the annotation of these target genes to highlight the biological processes and pathways potentially regulated by these structure-specific miRNAs. To perform this analysis, we used the Metascape software (<http://metascape.org>) and we represented the data in Circos plots (Krzywinski *et al*, 2009).

This analysis showed that the enriched/depleted miRNAs potentially regulate many mRNAs which are involved in nervous system related biological processes and pathways. For instance, in the olfactory bulb, the predicted targets are involved “neuron projection morphogenesis”, “regulation of cell projection organization” or “signaling by NGF” (Figure 7). Strikingly, in the cortex most of the enriched Gene Ontology terms referred to the neuronal physiology. Biological processes such as “regulation of neuronal death”, “neuron-neuron synaptic transmission” were statistically enriched (Figure 8). This analysis was less convincing in the hippocampus, certainly because there was only one specific miRNA for this structure (Figure 9). Interestingly, in the striatum, only one miRNA was specifically enriched (a newly discovered miRNA, novel-miR-26-3p) but it potentially targets multiple mRNAs related to the “dopaminergic synapse” (Figure 10). Finally, in the spinal cord we found many enriched/depleted miRNAs and the gene annotation analysis highlighted many generic biological processes such as “small GTPase mediated signal transduction” or “embryonic morphogenesis” but also nervous system specific terms like “positive regulation of neurogenesis” (Figure 11).

Finally, as a proof of concept, we quantified the expression level of some of the predicted targets in the different CNS structures. We focused our attention on the two structures that

contained the highest number of specific miRNAs, the olfactory bulb and the spinal cord. In the spinal cord, we showed that miR-10a was specifically enriched compared to other CNS structures while one of its targets, the GABA receptor GABR2, was significantly over-expressed (Figure 12A). More interestingly, in the olfactory bulb, one of the newly discovered miRNAs, novel-miR-42-5p, was significantly depleted and two of its predicted targets, the transcription factor ETV1 and the olfactory receptor OLR1584, were over-expressed (Figure 12B).

Altogether, these results suggest the critical role played by these enriched/depleted miRNAs in the transcriptomic and functional identities of CNS structures.

Discussion

The aim of this study was to determine the miRNome of five major structures of the CNS : the cortex, the hippocampus, the olfactory bulb, the striatum and the spinal cord.

Even if other works used small RNA-Seq to study the miRNome of the rat brain, these studies either focused on a specific structure such as the hippocampus (Shinohara *et al*, 2011) or the hypothalamus (Amar *et al*, 2012), or on different stages of development (Yin *et al*, 2015; Yao *et al*, 2012). Our study is original because we compare the physiological miRNome of 5 different structures of the CNS in adult rats.

Three principal methods are used to measure the expression levels of miRNAs in a tissue : RT-qPCR (Chen *et al*, 2005; Shi & Chiang, 2005), microarray hybridization (Yin *et al*, 2008), and small RNA-Seq (Hafner *et al*, 2008), all of which face unique challenges compared to their use in miRNA profiling. However, RNA-Seq offers competitive advantages, such as enabling discovery of new sequences variants and new sequences (Willenbrock *et al*, 2009). Consequently, we performed small RNA-Seq to obtain an exhaustive analysis of the miRNome of these five CNS structures and we found a total of 90 novel miRNAs. The number of novel miRNAs discovered by small RNA-Seq experiments is hard to predict since it depends on many parameters like the nature of samples (culture, tissues, fluids), the sequencing depth, the quality of the library, and finally the bioinformatic tools to predict novel miRNA and the efficiently discard false-positive novel miRNAs. In this regards, our results are in accordance with the literature. Indeed, using miRDeep2 as miRNA-prediction algorithm, recent studies found from 71 novel miRNAs in the mouse brain after an infection with Japanese encephalitis viruses (Li *et al*, 2016), up to 171 novel miRNAs in the rat brain comparing different ages (Yin *et al*, 2015). Unfortunately, the novel miRNAs discovered in Yin's study were not implemented in

miRBase. However, we aligned the sequences of their novel miRNAs against ours, and found matches for five miRNAs. Thus, Yin's novel-miR-16, novel-miR-18, novel-miR-20, novel-miR-32 and novel-miR-33 match with ours novel-miR-79-3p, novel-miR-64-5p, novel-miR-38-5p, novel-miR-87-5p and novel-miR-67-5p, respectively.

All the computational tools developed for identifying miRNAs from small RNA-Seq datasets suffer from high false positive and false negative rates, and also lack of consistency across species (Li *et al*, 2012; Williamson *et al*, 2013; Kang & Friedländer, 2015). Thus, we initially obtained more than 8000 novel miRNAs from our samples with the miRPro algorithm (based on miRDeep2) and we reduced this number to less than an hundred by applying filters such as the number of reads (>1cpm of total reads), and the presence in at least 2 independent samples.

In comparison with the miRNA database (miRBase) of mouse (*mus musculus*) (1915 mature miRNAs and 1193 precursors) and human (*homo sapiens*) (2558 mature miRNAs and 1881 precursors), the content of the rat miRNA database is low (*rattus norvegicus*) (765 mature miRNAs and 495 precursors). Even if we implement our novel miRNAs in miRBase, the rat dataset is still more than half less referenced than the mouse one and three times less referenced than the human one. This may be due to the fact that we focused our study only on the CNS. Nevertheless, our work significantly increases the knowledge on rat miRNA expression.

We searched orthologous sequences from our novel miRNAs in the mouse and human genomes since miRNAs that are well conserved across species often play crucial roles. Among the 90 novel miRNAs discovered, 12 have orthologous sequences in mouse and/or human organisms (we determined orthologs by a minimum of 95% of similarities between

the sequences). For example, both novel-miR-7-5p and novel-miR-8-3p are orthologs of the mouse miR-344-5p and miR-344h-3p, respectively. Interestingly, a work showed by RT-qPCR and *in situ* hybridization that miR-344-3p is detected in cortical regions surrounding the ventricular system, choroid plexus, glomerular layer of the olfactory bulb, and granular cell layer of the cerebellar cortex (Liu *et al*, 2014). They showed that miR-344-3p is neural-specific during mouse embryonic development, and that it may play an important role in CNS morphogenesis. In our analysis, we found that novel-miR-7-5p and novel-miR-8-5p are specifically underexpressed in the spinal cord, but expressed in all the other structures, roughly at the same level. It should be interesting to define more specifically the spatial and temporal distribution of these novel-miRNAs to compare with mouse miR-344 expression and function.

In addition, we found that the novel-miR-14-3p is significantly more expressed in the spinal cord compared to the other structures, and its sequence is orthologous with the miR-330-5p both in the mouse and the human. Even if no study on the miR-330 has been performed in the spinal cord, it seems to play an oncogenic role in glioblastoma disease by regulating SH3GL2 gene, (endophilin-1) (Qu *et al*, 2012; Yao *et al*, 2014). In a physiological context, the regulation of mRNA stability during a synaptic plasticity protocol in rat hippocampal neurons in culture, shows that the destabilized transcripts present an enrichment in sequence motifs corresponding to miRNAs, and among them miR-330-5p (Cohen *et al*, 2014). It would be particularly interesting to study the role of the novel-miR-14-3p in the spinal cord.

Finally, novel-miR-72-3p, significantly more expressed in the olfactory bulb compared to all the other structures, has orthologous sequences both with miR-16-1-3p in the mouse and in the human. In human tissue, miR-16 seems to be enriched in the brain tissue, and in

particular in neurons compared to glial cells (Wang *et al*, 2014). Moreover, miR-16 may play a pivotal role in the local regulation of axonal protein synthesis (Natera-Naranjo *et al*, 2010), and in neuronal differentiation in mouse, rat and human (Aranha *et al*, 2010). In addition, miR-16 is known to target the serotonin transporter, and could contribute to the therapeutic action of antidepressants in monoaminergic neurons (Baudry *et al*, 2010; Launay *et al*, 2011). Thus, it would be very interesting to study the predictive mRNA targets of novel-miR-72-3p and decipher its role in the olfactory bulb.

Furthermore, among the 90 novel miRNAs discovered, we found 23 miRNAs that we called “functional orthologs”, meaning that they share the same seed region with other miRNAs. However, it cannot be assumed that they are functionally equivalent, hence further reporter-gene assays have to be performed to confirm their targets.

The increasing amount of small RNA-Seq data provides a more complete view of the miRNome, with the discovery of novel canonical miRNAs, and many other miRNA-like small RNAs that originate from non canonical miRNA genes. In addition, the increasing number of novel miRNAs discovered across the literature, sometimes repeatedly such as Yin’s work and ours, increases the complexity of miRNA indexation. These arguments enforce to revise miRNA’s nomenclature conventions to ease the comparison of miRNA research across species (Desvignes *et al*, 2015).

Characterization of 5’-end sequence of miRNAs is important because this so-called seed region of miRNAs is critical in miRNA-target mRNA binding (Engels & Hutvagner, 2006). We found that U is the most representative nucleotide in the 5’ position of the novel miRNA sequences, followed by C and A. More particularly, analysis of nucleotide sequences in eukaryotic miRNAs showed a clear bias for U or A at the 5’ position (Frank *et*

al, 2010). Results from others studies of other organisms are consistent (Zhou *et al*, 2009; Wei *et al*, 2011; Ji *et al*, 2012; Pacholewska *et al*, 2016). This result reinforces the biological pertinence of our novel miRNAs.

It is well described that tissue and cell-specific expression patterns of miRNAs are responsible for their particular biological function within a specific system. For example, the most famous brain-enriched miRNA, miR-124, defines brain-specific gene expression in human cells (Lim *et al*, 2005).

Our study reveals that some miRNAs are specifically enriched or depleted in five different structures of the CNS. We found 17 enriched miRNAs in the olfactory bulb, and among them the expression of all the members of the well-described miR-183 and miR-200 families. miR-183 family (Dambal *et al*, 2015) is composed of miR-182, miR-183 and miR-96, and miR-200 family (Senfter *et al*, 2016) is composed of miR-200a, b, c and miR-429. The members of the miR-183 family are known to be involved in sensory specific functions, such as the cochlear inner or outer hair cells (Kuhn *et al*, 2011; Weston *et al*, 2011; Zhu *et al*, 2011; Xu *et al*, 2007). Concerning the miR-200 family, some studies demonstrate that they have an important role for the regulation of the proliferation and the differentiation of neuronal cells (Beclin *et al*, 2016; Pandey *et al*, 2015). More interestingly, a work incriminates the miR-200 family in the regulation of the olfactory neurogenesis (Choi *et al*, 2008), which is in accordance with our results showing an over-representation of all of the members of this family of miRNAs in the olfactory bulb compared to the other structures. Furthermore, these miRNAs, as well as miR-26a that we also found over-expressed in the olfactory bulb, have already been found over-represented in this structure in the mouse brain (Bak *et al*, 2008). Hence, these miRNAs seem to be crucial for the olfactory bulb.

Moreover, even if in the mouse brain the miR-128 has been found enriched in the cortex, the hippocampus, and the olfactory bulb (Bak *et al*, 2008), in our study miR-128 was only enriched in the cortex. MiR-128 was also found enriched in the young and adult rat cortex (Yao *et al*, 2012). These conflicting results may be the result of the different technologies used for miRNA quantification, microarray for Bak and Yao and small RNA-Seq for us. It may also reflect the heterogeneity of the cortex that should be dissected in multiple regions before the analysis.

In the same manner, we found 13 miRNAs specifically over-expressed in the spinal cord compared to the other cerebral regions. Two families are represented : miR-196 family, represented by miR-196a and b (Chen *et al*, 2011), and miR-10 family, represented by miR-10a and b (Tehler *et al*, 2011). Interestingly, some paper demonstrate the role of the miR-196 in the regulation of the motor neuron programs (Asli & Kessel, 2010). Furthermore, the majority of our results are in accordance with the literature: miR-451, miR-34a, miR-338, miR-219, miR-1, miR-10a, miR-10b, that are specifically expressed in the spinal cord in our study, are also found specific of this region in the mouse (Bak *et al*, 2008). An other interesting fact concerns miRNAs that are specifically under-expressed in the spinal cord compared to the other structures. Among the five under-expressed miRNAs, two novel miRNAs, the novel-miR-7 and the novel-miR-8, are orthologous sequences with the known miR-344. More interestingly, another member of this family, the miR-344g, is also specifically under-represented in the spinal cord. This miRNA is known to play a role in the specification of neural program during the mouse embryonic development (Liu *et al*, 2014). The specificity of spinal cord morphology and function compared to the brain regions may be, in part, the result of a characteristic miRNome.

We went further in the analysis, and correlated the expression of miRNAs with their predictive mRNA targets by RT-qPCR. In the spinal cord, we correlated the specific over-expression of miR-10a with the specific under-expression of the mRNA target GABR2, one of the receptors of the inhibitory neurotransmitter GABA. This result has not been described before but the role of inhibitory controls in the spinal cord is well known and its implication in neuropathic pain mechanisms highlighted (Laffray *et al*, 2012). Finally, in the olfactory bulb, the novel-miR-42-5p was specifically depleted while two of its predictive targets, ETV1 and OLR1584 were over-expressed. Such results have not been yet reported, however, the expression of ETV1, a transcription factor, has been revealed in the medial habenula, the periventricular thalamic nucleus, and the medulla oblongata region of the mouse brain (Tan & Scotting, 2015), considered as regions of brain-cell progenitors. In addition, ETV1 has been shown to promote the developmental expression of dendritic and synaptic genes in cerebellar granule neurones (Ding *et al*, 2016). More particularly, ETV1 transcription factor controls coordinately, but in opposite directions, the expression of maturation genes and immaturation genes and specifies the identity of maturing cerebellar granule cells (Okazawa *et al*, 2016). These results could be relevant because the olfactory bulb is a brain region with a high rate of cellular renewal, and consequently with many brain cell progenitors. Even if these results have to be confirmed by other techniques, they suggest that miRNAs may play an important role in the specification and the function of the specific structures of the rat CNS, and will help further studies in dissecting biological functions of miRNAs in the CNS.

Material and methods

Animals

Three male Wistar rats aged of 12 weeks were dissected to collect central nervous system tissues. All experimental procedures followed the ethical guidelines of the University of Bordeaux's ethics committee. Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital, and then perfused with aCSF (NaCl 130,5 mM ; KCl 2,4 mM, MgSO₄ 1,3 mM ; KH₂PO₄ 1,2 mM ; HEPES 1,25 mM ; CaCl₂ 2,4 mM ; Glucose 10 mM ; NaHCO₃ 19,5 mM) in order to wash out blood from the nervous tissue and avoid contaminations with blood cells RNA.

Sample collection and RNA extraction

From each rat, 5 structures of the central nervous system were dissected : the olfactory bulb, a part of the cortex, the hippocampus, the striatum and the dorsal spinal cord, and immediately placed into a 1,5 mL tube containing 700 uL of TriZol reagent (Qiagen), on ice. Samples were crushed with the Fast Prep 24 instrument (MP Biomedicals). Total RNA was extracted following the manufacturer's instructions, allowing an enrichment of the small RNAs (miRNeasy Micro Kit, Qiagen). The quality and the quantity of the RNA samples were determined with a spectrophotometer Nanodrop-one (Ozyme), and with an RNA chips (Agilent RNA 600 Nano kit) into the BioAnalyzer 2100 (Agilent).

Small-RNA libraries preparation and sequencing

The libraries were synthesized from 1 ug of RNA for each sample, following the manufacturer's instructions (NEXTflex Illumina Small RNA Seq Prep, BiooScientific). Briefly, 3' adenylated adaptaters, followed by 5' adaptaters were sequentially added to RNA strands. Then RNA samples were reverse transcribed using the 3' adaptaters as the template for the RT primer. Finally cDNA were amplified by PCR. Then, the quality and

the quantity of cDNA were analyzed with a DNA chip (Agilent), at Pierroton, INRA, France.

A size selection of the cDNA libraries (150 pb) was performed with a pippinprep (Sage science). All the samples were pooled in an equimolar manner, and purified on column (MinElute PCR Purification kit, Qiagen). Finally, cDNA quality and quantity were checked with a DNA chip (Agilent) before sequencing. The samples were sent to the functional genomic platform of Nice-Sophia Antipolis, France (<https://www.france-genomique.org/spip/spip.php?article35&lang=fr>). The next generation single-read sequencing was performed using the sequencer NextSeq 500, Illumina, with a depth of 8 millions of reads. The preliminary results are the followings :

Total reads : 454577868

Filtered too short reads (size <15b) : 1150734 (0,3% of total)

Not filtered reads :

1) reads ready to be mapped with Bowtie2 : 453427134 (99,7% of total)

2) unmapped reads, with low quality mm>2 or contamination reads: 17632800 (3,9 % of unfiltered reads)

3) mapped reads

- ready to be annotated : 435794334 (96,1 % of unfiltered reads)

- not annotated reads, aligned in unannotated regions : 72073770 (16,5 % of mapped reads)

- annotated reads : 363720564 (83,5 % of mapped reads)

-miRNA reads : 363720564 (100 % of annotated)

The raw data are available here : ([link](#)).

The sequences quality were assessed with FastQC software (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

Identification of conserved and novel microRNAs by bioinformatic analysis

To obtain clean reads, the adaptor sequences (from the libraries preparation), and the 4 nucleotids inserted between the adaptor sequence and the sequence of the microRNAs were removed, using Cutadapt tool. The *rattus norvegicus* genome reference was downloaded from UCS Genome Browser assembly ID:m6. All the bioinformatic analysis were performed using the program miRPro (Shi *et al*, 2015b), which uses the main algorithm of the software miRDeep2 (Friedländer *et al*, 2012). The main advantage of miRPro compared to miRDeep2 is that it proposes consistent and unified names for novel precursors and their mature miRNAs in all libraries of the samples. The reads issued from the sequencing are aligned against the genome of reference by using Novoalign (Li & Homer, 2010).

Sequences matching known rat small RNAs such as rRNA, scRNA, snoRNA, snRNA and tRNA or degradation fragments of mRNAs were excuded in further analysis, and sequences that perfectly matched the rat genome along their entire lenght and recognized as miRNAs were subjected to subsequent analysis.

The small cleaned RNAs aligned against the miRNA database, that cannot be annotated to any previous category, were subjected to novel miRNA prediction software miRPro (Shi *et al*, 2015b). Briefly, after the matching of the reads with the genome of reference, the genome is scanned from 5' to 3', to excise potential precursor sequences. Then, the software creates an index of potential precursors. After, the reads are aligned with the potential precursors. Finally, the predictive structures are performed by the software RNAfold.

Selection of microRNAs

In order to avoid false positive miRNAs, we kept miRNAs found at least in two samples of each structure. Then, we kept miRNAs obtained more than 1 count per million of sequences, in at least 2 samples per structure.

Orthologs among new microRNAs discovered

Sequences of new miRNAs were aligned against mouse and human sequences (obtained from miRBase (<http://www.mirbase.org/>)) (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014, 2011) using Blast software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ortholog sequences were determined from a sequence homology more than 95 % of identity between the two sequences. Moreover, functional orthologs were determined with a perfect homology into the seed region.

Characterization of novel microRNA nucleotidic sequence

We used the software suite MEME (<http://meme-suite.org>) to statistically analyse the nucleotidic composition of novel miRNA sequences.

Identification of differentially expressed microRNAs and specific microRNAs

We compared the miRNA expression profiles between the nervous system structures, using DESeq2 (Love *et al*, 2014) under the software R. We considered miRNAs as differentially expressed between structures when the p-value <0.05. We considered a miRNA as specific of a structure when it was mainly overexpressed or underexpressed in one structure compared to all the others, following these criteria : log2-fold change >2 or < -2 and p-value <0,05.

microRNAs target prediction

To understand the function of selected known miRNAs, based on their abundance, and/or their ability to be differentially expressed, we used the algorithm of the database Targetscan 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/) (Shin *et al*, 2010; Agarwal *et al*, 2015). For novel miRNAs, we used miRDB (<http://www.mirdb.org/>). We selected mRNA targets that have particular known functions in the nervous system.

The signaling pathway of mRNA targets were analyzed using Gene Ontology Enrichment analysis (<http://www.geneontology.org/>).

Validation of the sequencing data, and expression analysis of microRNA target genes by qPCR

To confirm the expression of some miRNAs revealed by RNA-Seq, 12 conserved miRNAs and 3 novel miRNAs were selected for validation by RT qPCR. Moreover, 25 mRNA targets of miRNAs were also quantified.

An amount of 1 ug of total RNA from each sample was reverse transcribed into cDNA following the manufacturer's instructions using miScript II RT kit (Qiagen) using HiFlex buffer in a thermocycler (Eppendorf). An amount of 5 ng of cDNA per well was used to perform the qPCR, using miRNA-specific primers in combination with an universal primer. U6 RNA was used as the internal control. For mRNAs, 2 specific primers were used and DSHA was used as the internal control. QPCR was performed in triplicate, using the manufacturer's instructions (SYBR Premix Ex Taq, Tli RnaseH plus, Takara), on a Light Cycler 480 II, Roche, following these steps : the pre-incubation : 1 cycle, 95°C, 30s, the amplification : 55 cycles : first 95°C, 5s, then 60°C, 30s, the melting curve : 95°C, 5s, 60°C, 60s, and the cooling : from 95°C to 40°C. The DCp method was used for analysis.

Statistical analysis

To evaluate the differential expression of miRNAs in the five structures, we used the DESeq2 algorithm in the R software. Shapiro-Wilk's test was realized with R on the sequence counts results to evaluate the normal distribution of the sample. Then, in regard to the distribution of the sample, we performed either a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test, or a one-way analysis of variance, followed by a Bonferroni post-hoc test. The significance level was set at $p < 0,05$.

To analyse the RT-qPCR results, Shapiro-Wilk's test was realized with R on the DCp values to evaluate the normal distribution of the sample. Then, in regard to the distribution of the sample, we performed either a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test, or a one-way analysis of variance, followed by a Bonferroni post-hoc test. The significance level was set at $p < 0,05$.

Table of qPCR primers

Name	Sequence
Rno-miR-3065-3p	GCGTCAACAAAATCACTGATGCT
Rno-miR-3065-5p	GCACCAGGATATTGTTGGGGA
Rno-novel-miR-44	GCGATCATCATCATCATTATCATCA
Rno-novel-miR-28	CCCTGGCTCTGCTGGATC
Rno-novel-miR-49	TGCCCCGCAGACTCTGAGCT
AQP4-F	GTCACCACGGTTCATGGA
AQP4-R	GAAAGTGATTATTAGCTCCACCCAG
CAMK1D-F	CGCCTATATCCTGCTCTGTG
CAMK1D-R	TCATATTCTGCCTTGAGGATCTG
OLR1584-F	AGGGAACCTTGTCATCATTGTC
OLR1584-R	GTGCTGACATAACCAGATTTC
ETV1-F	CAATGTCAGTGCCTATGATCAG
ETV1-R	AGTGCTGGATGGTGTGG

KCNH5-F	GTGGCTATCTTAGGGAAAGGT
KCNH5-R	CAGGTCACAGTAAGTCAGGG
NMU-F	ATGTTGTGTCGTCTGTCGT
NMU-R	GACCTCTTCCCATTGCGT
GRIN2B-F	TGCCTTCTTAGAGCCATTCAG
GRIN2B-R	CATCACAAACATCATCACCCAC
CIB4-F	AGATTCTGTGCATCCACGA
CIB4-R	ATGCGGTCTCTGAAAGGG
CNIH1-F	CCCTGAATCCTCTTGTGCT
CNIH1-R	CGCTCATCACTGGTCTACTC
GABRB2-F	CTCCACAGGTTCTTATCCCAG
GABRB2-R	GCAGAAGCATCATAGTTGATCC
NCS1-F	GGCTACATCACCAGAAACGA
NCS1-R	TCCCATCAGCGTTCTTATCC
TPPP-F	CAGCAAGATCAAAGGGAAGTC
TPPP-R	TTCCTCGCTGCTCTTATCC
PCDH9-F	CTTTCCAATCCCATCAGCCA
PCDH9-R	GTTTCCACGATATCCAGTCCA
FZD3-F	GTCCGTACCAGGTTACTCAG
FZD3-R	GAATCCCAACTATGAGAGCCA
PALM-F	TACCTGAAGTCCAAGGCAC
PALM-R	GCTTCTCATGTCCTCGT
ELAVL3-F	AAGAATGGTCACTCAGATACTGG
ELAVL3-R	GGTAGTTGACGATGAGGTTGG
EPN1-F	GCCCTTAGTTTGAGCCGA
EPN1-R	ATCCATAAGAGATGACTCCTCCT
KLF12-F	GATGATGACCTGCCAAATGTG
KLF12-R	GATGGATGGACCTCTGTACTG
CFL1-F	AAACTGACAGGAATCAAGCAC
CFL1-R	CTTGACCTCCTCGTAGCAG
PALLD-F	GTGTCCGCCAAGAACGA

PALLD-R	GATGCCACTGGGTGTAGAC
CTTN-F	CCTCCCAGAAAGACTACTCCA
CTTN-R	ACGGTCAGCTTGCCTC
HTR2A-F	TCATCATGGCAGTGTCCC
HTR2A-R	ACCGGTACCCATACAGGA
CLCN3-F	CATACTATTGACTGGGTGCGA
CLCN3-R	TTTACTGTTGATCCGTCTGTG
KCNK10-F	GGAAACTCCTCCAACAGCA
KCNK10-R	ATATTCCCATACCCTATGGTCGT
OR51E2-F	CACAATTTCCAGGCTGTTCC
OR51E2-R	TGAGCTTCCTCCAGTCCT
CAMK2N1-F	GACACCAACAACCTTCTTCGG
CAMK2N1-R	CAATAACAACGCGCTTGCT
SLC1A1-F	CATCACGATCAGCATCACAG
SLC1A1-R	GGCACTCAACACGATCAC
rno-miR-183	GGT-ATG-GCA-CTG-GTA-GAA-TTC-ACT
rno-miR-182	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACCG
rno-miR-141-3p	TAA-CAC-TGT-CTG-GTA-AAG-ATG-G
rno-miR-141-5p	CAT-CTT-CCA-GTG-CAG-TGT-TGG-A
rno-miR-200a	CAT-CTT-ACC-GGA-CAG-TGC-TGG-A
rno-miR-200b	CAT-CTT-ACT-GGG-CAG-CAT-TGG-A
rno-miR-200c	GTC-TTA-CCC-AGC-AGT-GTT-TGG
rno-miR-196a	CGG-CAA-CAA-GAA-ACT-GCC-TGA
rno-miR-196b	TAG-GTA-GTT-TCC-TGT-TGT-TGG-G
rno-miR-10a	GCC-AAA-TTC-GTA-TCT-AGG-GGA-ATA
rno-miR-10b	GCA-GAT-TCG-ATT-CTA-GGG-GAA-TA
rno-miR-96	TTTGGCACTAGCACATTTTGCT
Universal primer	GAATCGAGCACCAGTTACGCATG

Bibliography

- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W & Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* **4**:
- Aksoy-Aksel A, Zampa F & Schratt G (2014) MicroRNAs and synaptic plasticity--a mutual relationship. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**:
- Amar L, Benoit C, Beaumont G, Vacher CM, Crepin D, Taouis M & Baroin-Tourancheau A (2012) MicroRNA expression profiling of hypothalamic arcuate and paraventricular nuclei from single rats using Illumina sequencing technology. *J. Neurosci. Methods* **209**: 134–143
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT & Jewell D (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol. CB* **13**: 807–818
- Aranha MM, Santos DM, Xavier JM, Low WC, Steer CJ, Solá S & Rodrigues CMP (2010) Apoptosis-associated microRNAs are modulated in mouse, rat and human neural differentiation. *BMC Genomics* **11**: 514
- Asli NS & Kessel M (2010) Spatiotemporally restricted regulation of generic motor neuron programs by miR-196-mediated repression of Hoxb8. *Dev. Biol.* **344**: 857–868
- Bak M, Silahatoglu A, Møller M, Christensen M, Rath MF, Skryabin B, Tommerup N & Kauppinen S (2008) MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA N. Y. N* **14**: 432–444
- Bali P & Kenny PJ (2013) MicroRNAs and Drug Addiction. *Front. Genet.* **4**: 43
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281–297
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215–233
- Baudry A, Mouillet-Richard S, Schneider B, Launay J-M & Kellermann O (2010) miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* **329**: 1537–1541

- Beclin C, Follert P, Stappers E, Barral S, Nathalie C, de Chevigny A, Magnone V, Lebrigand K, Bissels U, Huylebroeck D, Bosio A, Barbry P, Seuntjens E & Cremer H (2016) miR-200 family controls late steps of postnatal forebrain neurogenesis via Zeb2 inhibition. *Sci. Rep.* **6**: 35729
- Bernard O (2007) Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 1071–1076
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM & Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363–366
- Bredy TW, Lin Q, Wei W, Baker-Andresen D & Mattick JS (2011) MicroRNA regulation of neural plasticity and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **96**: 89–94
- Cai X, Hagedorn CH & Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* **10**: 1957–1966
- Carrington JC & Ambros V (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**: 336–338
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ & Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **33**: e179
- Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM & Yao Q (2011) MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **15**: 14–23
- Choi PS, Zakhary L, Choi W-Y, Caron S, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, McManus M, Harfe B, Giraldez AJ, Horvitz HR, Schier AF & Dulac C (2008) Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis. *Neuron* **57**: 41–55
- Cohen JE, Lee PR & Fields RD (2014) Systematic identification of 3'-UTR regulatory elements in activity-dependent mRNA stability in hippocampal neurons. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**:
- Conaco C, Otto S, Han J-J & Mandel G (2006) Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 2422–2427

- Dambal S, Shah M, Mihelich B & Nonn L (2015) The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic Acids Res.* **43**: 7173–7188
- Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, Singer A & Postlethwait JH (2015) miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet. TIG* **31**: 613–626
- Díaz NF, Cruz-Reséndiz MS, Flores-Herrera H, García-López G & Molina-Hernández A (2014) MicroRNAs in central nervous system development. *Rev. Neurosci.* **25**: 675–686
- Ding B, Cave JW, Dobner PR, Mullikin-Kilpatrick D, Bartzokis M, Zhu H, Chow C-W, Gronostajski RM & Kilpatrick DL (2016) Reciprocal autoregulation by NFI occupancy and ETV1 promotes the developmental expression of dendrite-synapse genes in cerebellar granule neurons. *Mol. Biol. Cell* **27**: 1488–1499
- Elramah S, Landry M & Favereaux A (2014) MicroRNAs regulate neuronal plasticity and are involved in pain mechanisms. *Front. Cell. Neurosci.* **8**: 31
- Engels BM & Hutvagner G (2006) Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* **25**: 6163–6169
- Favereaux A, Thoumine O, Bouali-Benazzouz R, Roques V, Papon M-A, Salam SA, Drutel G, Léger C, Calas A, Nagy F & Landry M (2011) Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *EMBO J.* **30**: 3830–3841
- Frank F, Sonenberg N & Nagar B (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* **465**: 818–822
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W & Rajewsky N (2012) miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* **40**: 37–52
- Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB & Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**: 92–105

- Gao J, Wang W-Y, Mao Y-W, Gräff J, Guan J-S, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC & Tsai L-H (2010) A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* **466**: 1105–1109
- Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, Rice A, Ojo T, Lin C, Holoch D, Lim C & Tuschl T (2008) Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods San Diego Calif* **44**: 3–12
- Hofacker IL (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3429–3431
- Ji Z, Wang G, Xie Z, Zhang C & Wang J (2012) Identification and characterization of microRNA in the dairy goat (*Capra hircus*) mammary gland by Solexa deep-sequencing technology. *Mol. Biol. Rep.* **39**: 9361–9371
- Kang W & Friedländer MR (2015) Computational Prediction of miRNA Genes from Small RNA Sequencing Data. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**: 7
- Kozomara A & Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **39**: D152-157
- Kozomara A & Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**: D68-73
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ & Marra MA (2009) Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* **19**: 1639–1645
- Kuhn S, Johnson SL, Furness DN, Chen J, Ingham N, Hilton JM, Steffes G, Lewis MA, Zampini V, Hackney CM, Masetto S, Holley MC, Steel KP & Marcotti W (2011) miR-96 regulates the progression of differentiation in mammalian cochlear inner and outer hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 2355–2360
- Laffray S, Bouali-Benazzouz R, Papon M-A, Favereaux A, Jiang Y, Holm T, Spriet C, Desbarats P, Fossat P, Le Feuvre Y, Decossas M, Hélot L, Langel U, Nagy F & Landry M (2012) Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3ζ in chronic pain conditions. *EMBO J.* **31**: 3239–3251

- Launay JM, Mouillet-Richard S, Baudry A, Pietri M & Kellermann O (2011) Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl. Psychiatry* **1**: e56
- Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S & Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**: 4663–4670
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH & Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**: 4051–4060
- Letellier M, Elramah S, Mondin M, Soula A, Penn A, Choquet D, Landry M, Thoumine O & Favereaux A (2014) miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling. *Nat. Neurosci.* **17**: 1040–1042
- Li G & Ling S (2017) MiR-124 Promotes Newborn Olfactory Bulb Neuron Dendritic Morphogenesis and Spine Density. *J. Mol. Neurosci. MN* **61**: 159–168
- Li H & Homer N (2010) A survey of sequence alignment algorithms for next-generation sequencing. *Brief. Bioinform.* **11**: 473–483
- Li X-F, Cao R-B, Luo J, Fan J-M, Wang J-M, Zhang Y-P, Gu J-Y, Feng X-L, Zhou B & Chen P-Y (2016) MicroRNA transcriptome profiling of mice brains infected with Japanese encephalitis virus by RNA sequencing. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **39**: 249–257
- Li Y, Zhang Z, Liu F, Vongsangnak W, Jing Q & Shen B (2012) Performance comparison and evaluation of software tools for microRNA deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* **40**: 4298–4305
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS & Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769–773
- Liu Q, He H, Zeng T, Huang Z, Fan T & Wu Q (2014) Neural-specific expression of miR-344-3p during mouse embryonic development. *J. Mol. Histol.* **45**: 363–372

- López-González MJ, Landry M & Favereaux A (2017) MicroRNA and chronic pain: From mechanisms to therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.*
- Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**: 550
- Maciotta S, Meregalli M & Torrente Y (2013) The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **7**: 265
- Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA & Maniatis T (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **27**: 435–448
- Natera-Naranjo O, Aschrafi A, Gioio AE & Kaplan BB (2010) Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA N. Y. N* **16**: 1516–1529
- Nelson PT, Wang W-X & Rajeev BW (2008) MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **18**: 130–138
- Okazawa M, Abe H & Nakanishi S (2016) The Etv1 transcription factor activity-dependently downregulates a set of genes controlling cell growth and differentiation in maturing cerebellar granule cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **473**: 1071–1077
- Olsen L, Klausen M, Helboe L, Nielsen FC & Werge T (2009) MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One* **4**: e7225
- Pacholewska A, Mach N, Mata X, Vaiman A, Schibler L, Barrey E & Gerber V (2016) Novel equine tissue miRNAs and breed-related miRNA expressed in serum. *BMC Genomics* **17**: 831
- Pandey A, Singh P, Jauhari A, Singh T, Khan F, Pant AB, Parmar D & Yadav S (2015) Critical role of the miR-200 family in regulating differentiation and proliferation of neurons. *J. Neurochem.* **133**: 640–652
- Pathania M, Torres-Reveron J, Yan L, Kimura T, Lin TV, Gordon V, Teng Z-Q, Zhao X, Fulga TA, Van Vactor D & Bordey A (2012) miR-132 enhances dendritic

morphogenesis, spine density, synaptic integration, and survival of newborn olfactory bulb neurons. *PLoS One* **7**: e38174

Qu S, Yao Y, Shang C, Xue Y, Ma J, Li Z & Liu Y (2012) MicroRNA-330 is an oncogenic factor in glioblastoma cells by regulating SH3GL2 gene. *PLoS One* **7**: e46010

Quinn RK, James MH, Hawkins GE, Brown AL, Heathcote A, Smith DW, Cairns MJ & Dayas CV (2017) Temporally specific miRNA expression patterns in the dorsal and ventral striatum of addiction-prone rats. *Addict. Biol.*

Rajman M, Metge F, Fiore R, Khudayberdiev S, Aksoy-Aksel A, Bicker S, Ruedell Reschke C, Raouf R, Brennan GP, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Bauer S, Norwood B, Veno MT, Krüger M, Braun T, Kjems J, Rosenow F, Henshall DC, et al (2017) A microRNA-129-5p/Rbfox crosstalk coordinates homeostatic downscaling of excitatory synapses. *EMBO J.* **36**: 1770–1787

Sarkar S, Jun S, Rellick S, Quintana DD, Cavendish JZ & Simpkins JW (2016) Expression of microRNA-34a in Alzheimer's disease brain targets genes linked to synaptic plasticity, energy metabolism, and resting state network activity. *Brain Res.* **1646**: 139–151

Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M & Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**: 283–9

Senfter D, Madlener S, Krupitza G & Mader RM (2016) The microRNA-200 family: still much to discover. *Biomol. Concepts* **7**: 311–319

Shi J, Dong M, Li L, Liu L, Luz-Madrigal A, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K & Liang C (2015a) mirPro-a novel standalone program for differential expression and variation analysis of miRNAs. *Sci. Rep.* **5**: 14617

Shi J, Dong M, Li L, Liu L, Luz-Madrigal A, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K & Liang C (2015b) mirPro-a novel standalone program for differential expression and variation analysis of miRNAs. *Sci. Rep.* **5**: 14617

Shi R & Chiang VL (2005) Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques* **39**: 519–525

- Shin C, Nam J-W, Farh KK-H, Chiang HR, Shkumatava A & Bartel DP (2010) Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol. Cell* **38**: 789–802
- Shinohara Y, Yahagi K, Kawano M, Nishiyori H, Kawazu C, Suzuki N, Manabe R & Hirase H (2011) miRNA profiling of bilateral rat hippocampal CA3 by deep sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**: 293–298
- Tan C & Scotting P (2015) Expression of Kit and Etv1 in restricted brain regions supports a brain-cell progenitor as an origin for cranial germinomas. *Cancer Genet.* **208**: 55–61
- Tan L, Yu J-T & Tan L (2015) Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* **51**: 1249–1262
- Tehler D, Høyland-Kroghsbo NM & Lund AH (2011) The miR-10 microRNA precursor family. *RNA Biol.* **8**: 728–734
- Volkow ND, Wang G-J, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress A-R, Jayne M, Ma Y & Wong C (2006) Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**: 6583–6588
- Wang W-X, Danaher RJ, Miller CS, Berger JR, Nubia VG, Wilfred BS, Neltner JH, Norris CM & Nelson PT (2014) Expression of miR-15/107 family microRNAs in human tissues and cultured rat brain cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **12**: 19–30
- Wang X (2014) Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**: 1377–1383
- Wei LQ, Yan LF & Wang T (2011) Deep sequencing on genome-wide scale reveals the unique composition and expression patterns of microRNAs in developing pollen of *Oryza sativa*. *Genome Biol.* **12**: R53
- Weston MD, Pierce ML, Jensen-Smith HC, Fritzsich B, Rocha-Sanchez S, Beisel KW & Soukup GA (2011) MicroRNA-183 family expression in hair cell development and requirement of microRNAs for hair cell maintenance and survival. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **240**: 808–819

- Willenbrock H, Salomon J, Søkilde R, Barken KB, Hansen TN, Nielsen FC, Møller S & Litman T (2009) Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA N. Y. N* **15**: 2028–2034
- Williamson V, Kim A, Xie B, McMichael GO, Gao Y & Vladimirov V (2013) Detecting miRNAs in deep-sequencing data: a software performance comparison and evaluation. *Brief. Bioinform.* **14**: 36–45
- Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B & Valle D (2007) MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J. Biol. Chem.* **282**: 25053–25066
- Yao M-J, Chen G, Zhao P-P, Lu M-H, Jian J, Liu M-F & Yuan X-B (2012) Transcriptome analysis of microRNAs in developing cerebral cortex of rat. *BMC Genomics* **13**: 232
- Yao Y, Xue Y, Ma J, Shang C, Wang P, Liu L, Liu W, Li Z, Qu S, Li Z & Liu Y (2014) MiR-330-mediated regulation of SH3GL2 expression enhances malignant behaviors of glioblastoma stem cells by activating ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *PloS One* **9**: e95060
- Yin JQ, Zhao RC & Morris KV (2008) Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol.* **26**: 70–76
- Yin L, Sun Y, Wu J, Yan S, Deng Z, Wang J, Liao S, Yin D & Li G (2015) Discovering novel microRNAs and age-related nonlinear changes in rat brains using deep sequencing. *Neurobiol. Aging* **36**: 1037–1044
- Zhou M, Wang Q, Sun J, Li X, Xu L, Yang H, Shi H, Ning S, Chen L, Li Y, He T & Zheng Y (2009) In silico detection and characteristics of novel microRNA genes in the *Equus caballus* genome using an integrated ab initio and comparative genomic approach. *Genomics* **94**: 125–131
- Zhu Q, Sun W, Okano K, Chen Y, Zhang N, Maeda T & Palczewski K (2011) Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina. *J. Biol. Chem.* **286**: 31749–31760

Acknowledgements

Anaïs Soula was funded by the French Ministry for Research and Fondation pour la Recherche Médicale. We thank Alexi Groppi and Macha Nikolski (LaBRI, Bordeaux) for their useful help in the bioinformatical analysis of the RNA-Seq and the Pierroton transcriptomic platform for the purification of the libraries.

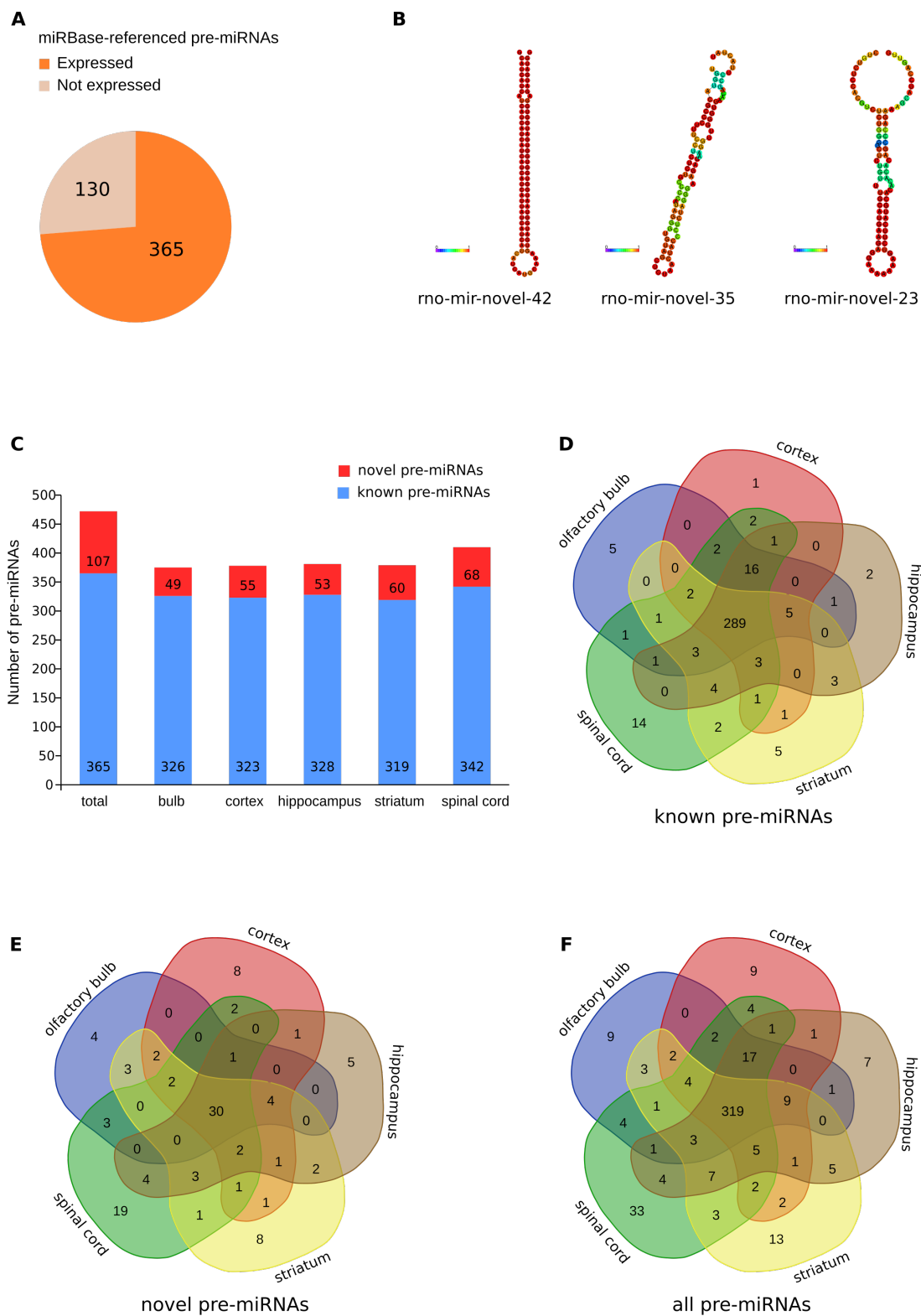


Figure 1 : miRNAs expressed in the CNS structures as revealed by RNA-Seq.

A : Pie-chart of miRBase-referenced miRNAs. Most of them are expressed in the CNS. **B** : Predictive structures of novel-miRNAs. It has been performed with RNAfold program. Colors represent the probability of matching between the bases. The predictive structures of novel-miRNAs are similar to those of known miRNAs. **C** : Histogram of the number of known and novel precursors of miRNAs expressed in each structure. **D, E, F** : Venn diagram of the repartition of miRNAs in the CNS structures considering miRBase-referenced miRNAs, novel miRNAs and referenced and novel miRNAs combined, respectively.

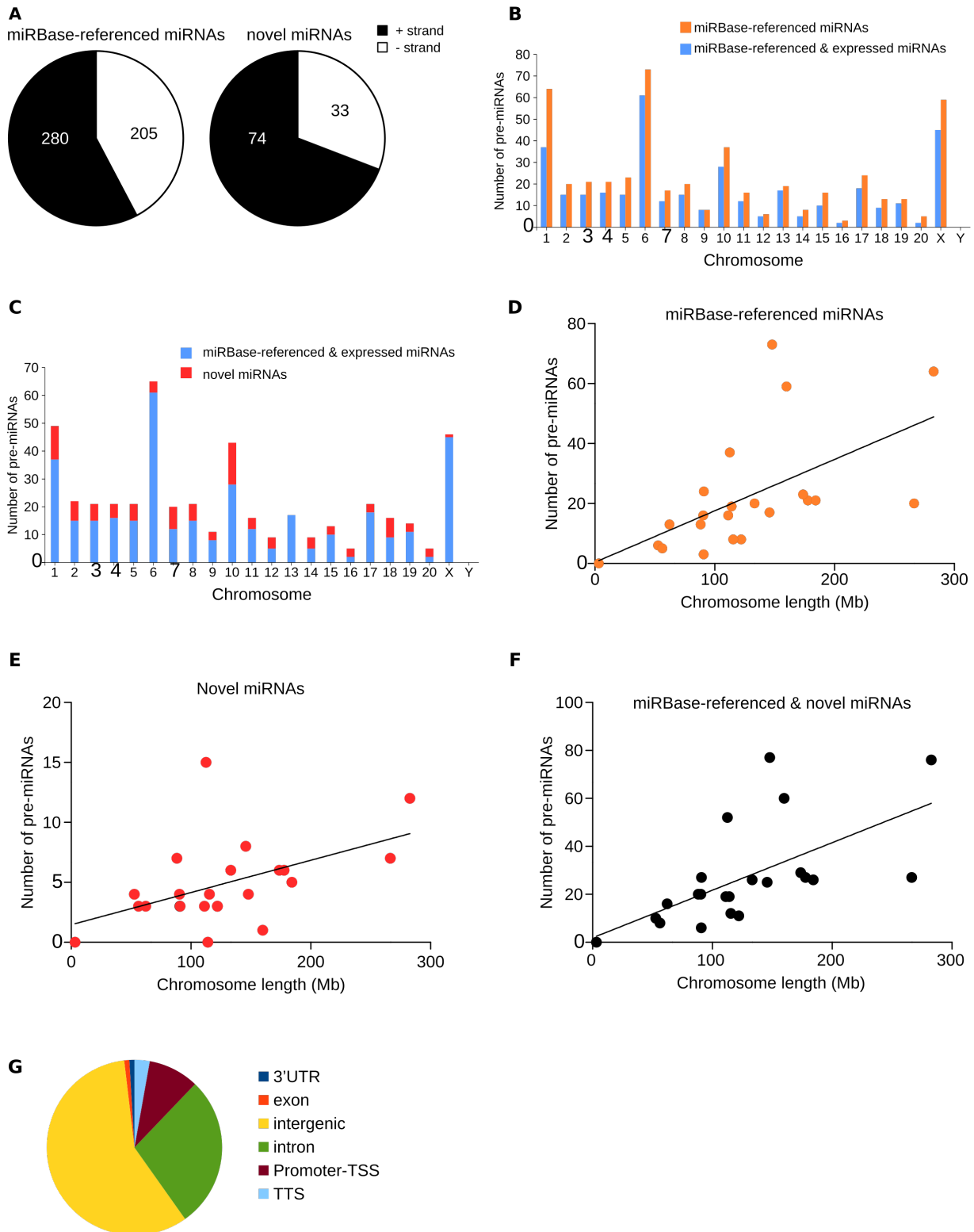


Figure 2 : Chromosomic repartition of miRNAs.

A : Histogram of the repartition of pre-miRNAs per DNA strand. There are more novel-miRNAs on the positive strand than for miRBase-referenced miRNAs, Fisher's exact test, $p\text{-value} < 0,05$. **B**, **C**, **D** : Histogram of the repartition of miRNAs per chromosome. There are 22 chromosomes in the *rattus norvegicus* species. **B** : miRBase-referenced miRNAs, **C** : novel miRNAs, **D** : referenced and novel miRNAs combined. **E**, **F**, **G** : Correlative analysis of the number of miRNAs in function of the length of the chromosome. **E** : miRBase-referenced miRNAs, **F** : novel miRNAs, **G** : referenced and novel miRNAs combined. Statistical analysis : Linear regression test, **E** : $R^2=0,3295$, $p\text{-value}= 0,0052$; **F** : $R^2=0,2473$, $p\text{-value}=0,0185$; **G** : $R^2=0,3814$, $p\text{-value}=0,0022$.

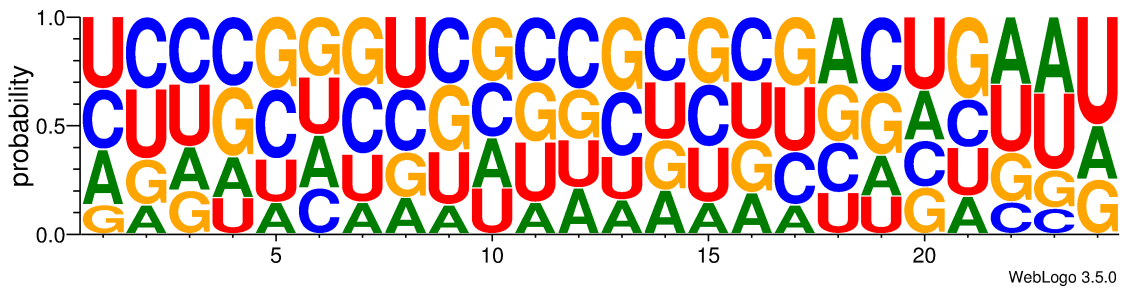


Figure 3 : Analysis of the nucleotidic composition of novel miRNAs.

The nucleotidic composition of all novel-miRNAs was compiled and the probability of each nucleotide at each position is plotted.

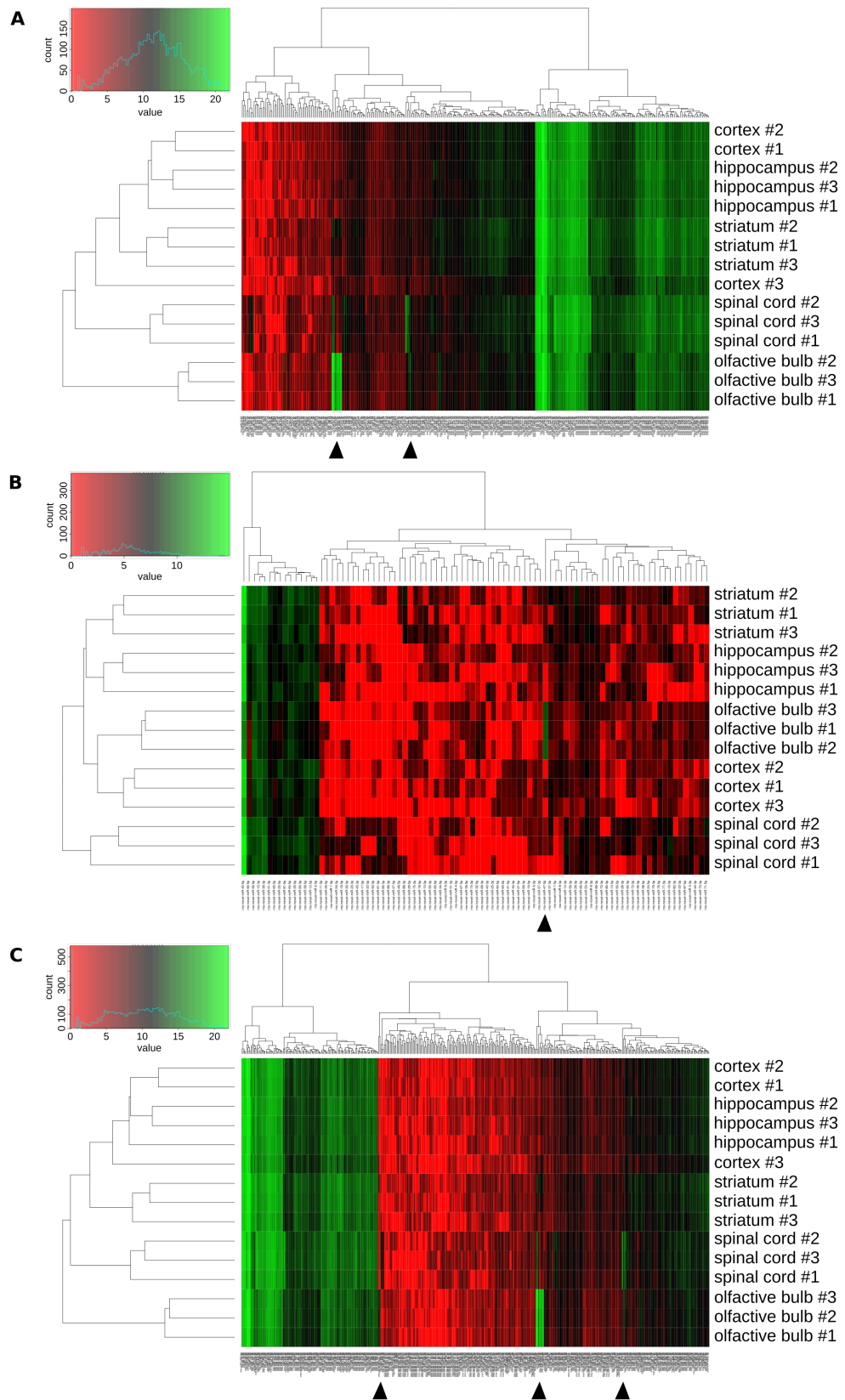


Figure 4 : Hierarchical clustering of the miRNome of the different CNS structures.

A, B, C : Heatmap representing the expression of each miRNA from all the studied structures. miRNAs are represented at the bottom. Sample structures are represented on the right, and statistical dendrogram of clusterization of the samples on the left. Colors represent the level of miRNA expression; red : high expression ; green : low expression. **A** : miRBase-referenced miRNAs ; **B** : novel miRNAs ; **C** : referenced and novel miRNAs combined. Black arrowheads indicate miRNAs those expression is structure-specific.

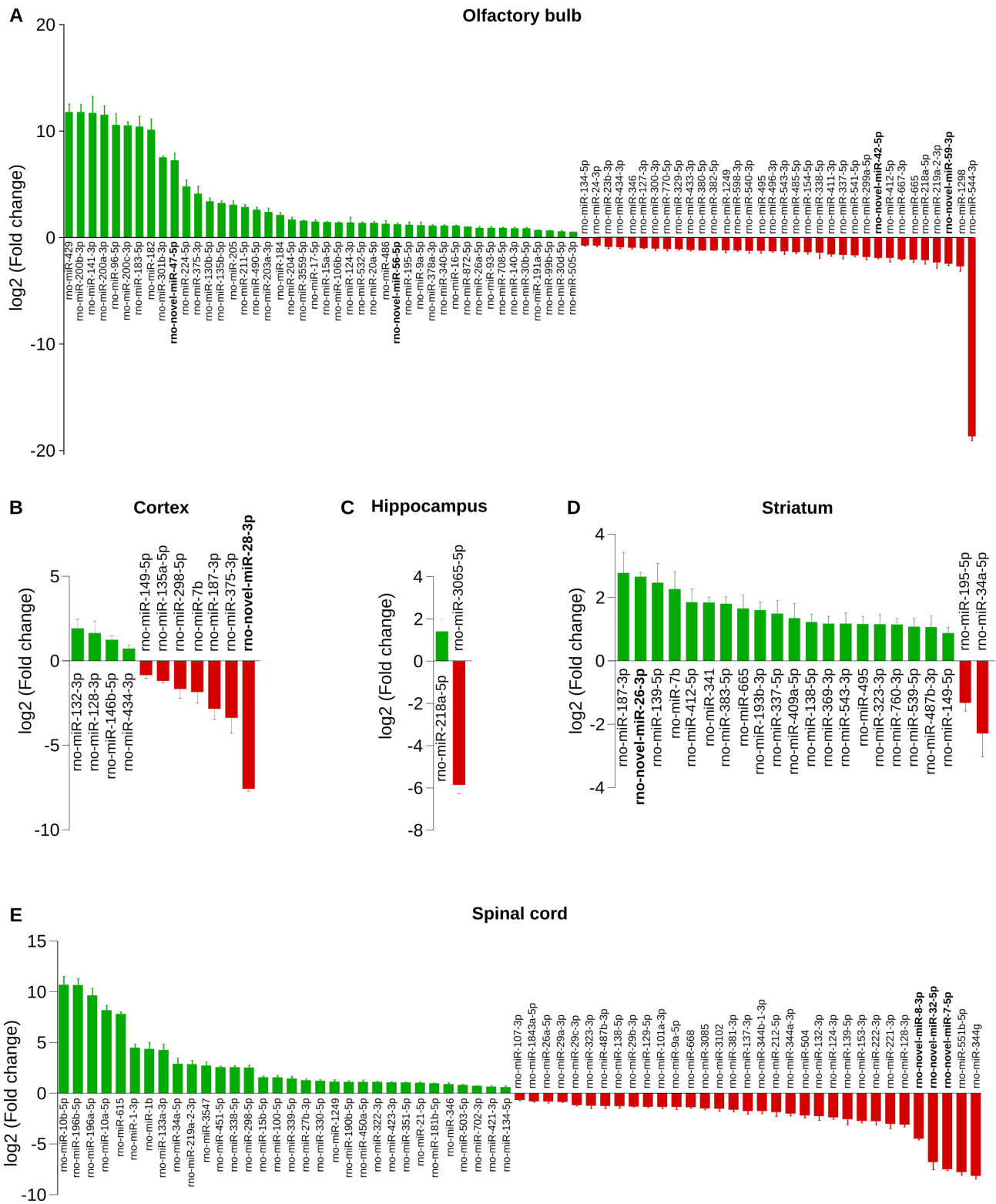


Figure 5 : Differentially-expressed miRNAs between the structures.

All the depicted miRNAs are statistically dis-regulated in the structure considered compared to all other structures as assessed with DESeq2 algorithm. The log2 of the fold change of over- (green) and down-regulated (red) miRNAs is indicated. miRNAs written in bold correspond to novel miRNAs. **A** : olfactory bulb ; **B** : cortex ; **C** : hippocampus ; **D** : striatum ; **E** : spinal cord.

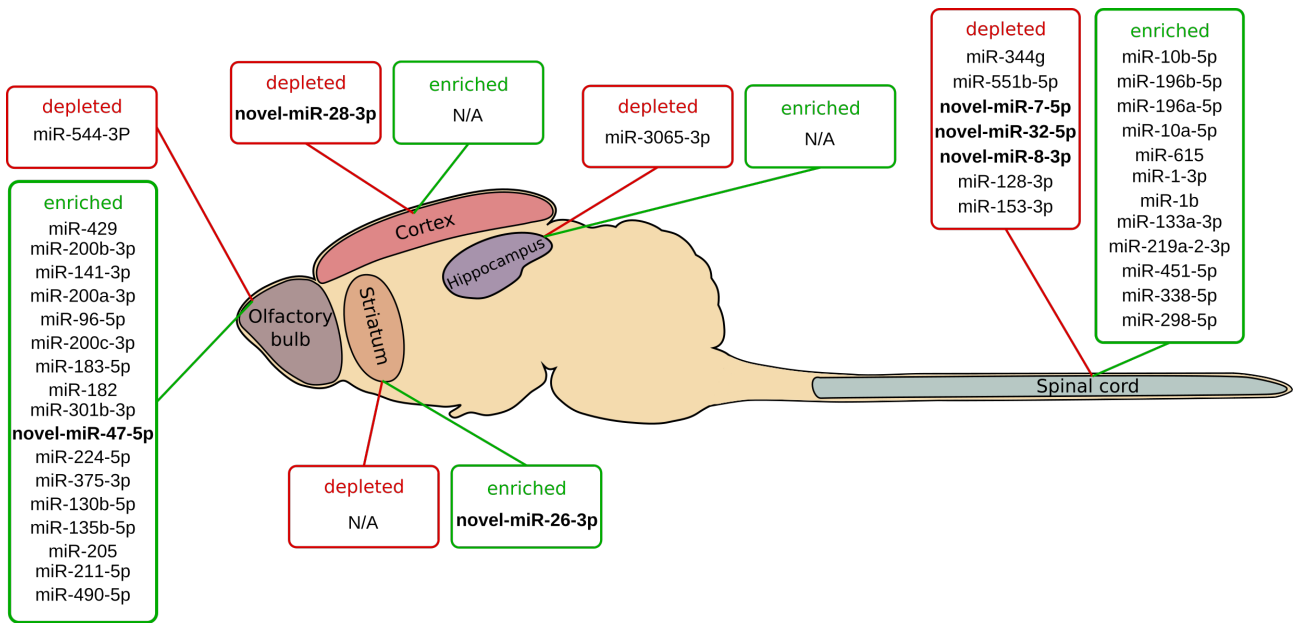


Figure 6 : Enrichment/depletion of miRNAs in specific structures.

Enriched miRNAs correspond to those with a fold-change > 4, and depleted miRNAs to a fold-change < -4. miRNAs written in bold correspond to novel miRNAs.

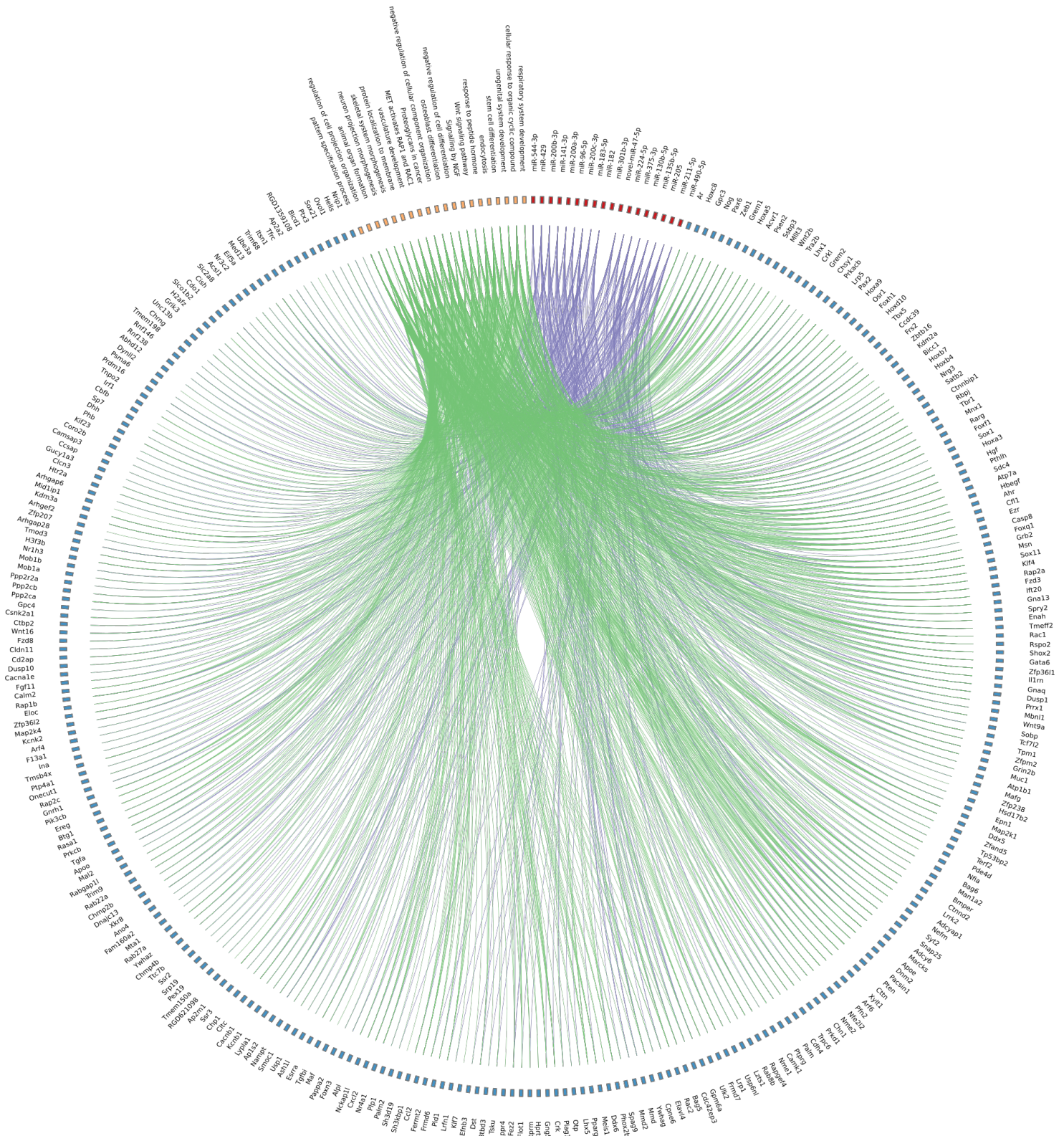


Figure 7: Circos plot representing the predictive mRNA targets of enriched/depleted miRNAs in the olfactory bulb, and their associated GO terms.

Target predictions were performed with Targetscan and GO terms analysis was done on the top 50 predictive mRNA targets with the Metascape software. The colors correspond to the following : red : miRNAs, blue : predictive target genes ; orange : GO terms, purple : link between miRNAs and predictive target genes ; green : link between genes and their associated GO terms.

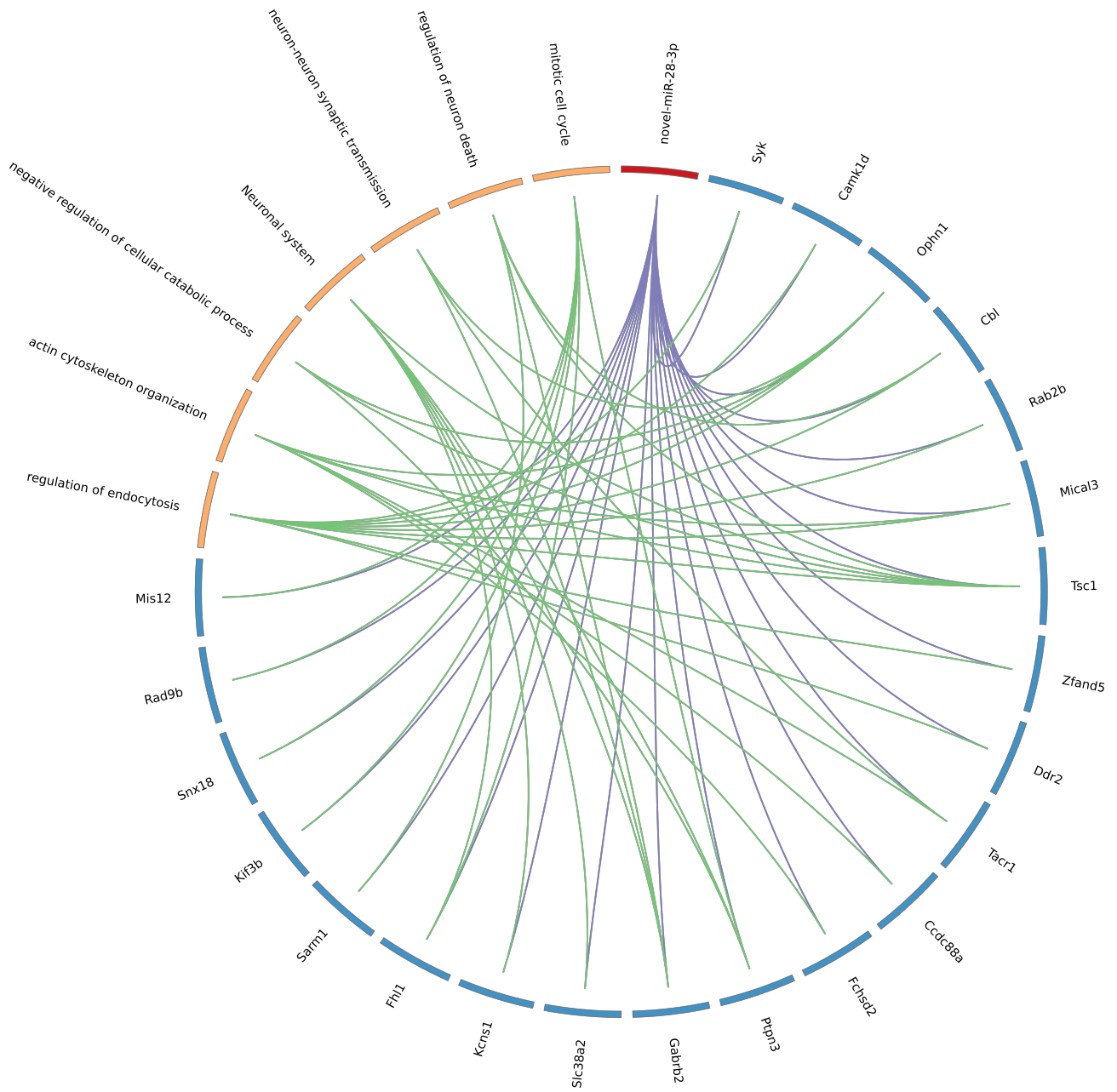


Figure 8 : Circos plot representing the predictive mRNA targets of enriched/depleted miRNAs in the cortex, and their associated GO terms.

Target predictions were performed with Targetscan and GO terms analysis was done on the top 50 predictive mRNA targets with the Metascape software. The colors correspond to the following : red : miRNAs, blue : predictive target genes ; orange : GO terms, purple : link between miRNAs and predictive target genes ; green : link between genes and their associated GO terms.

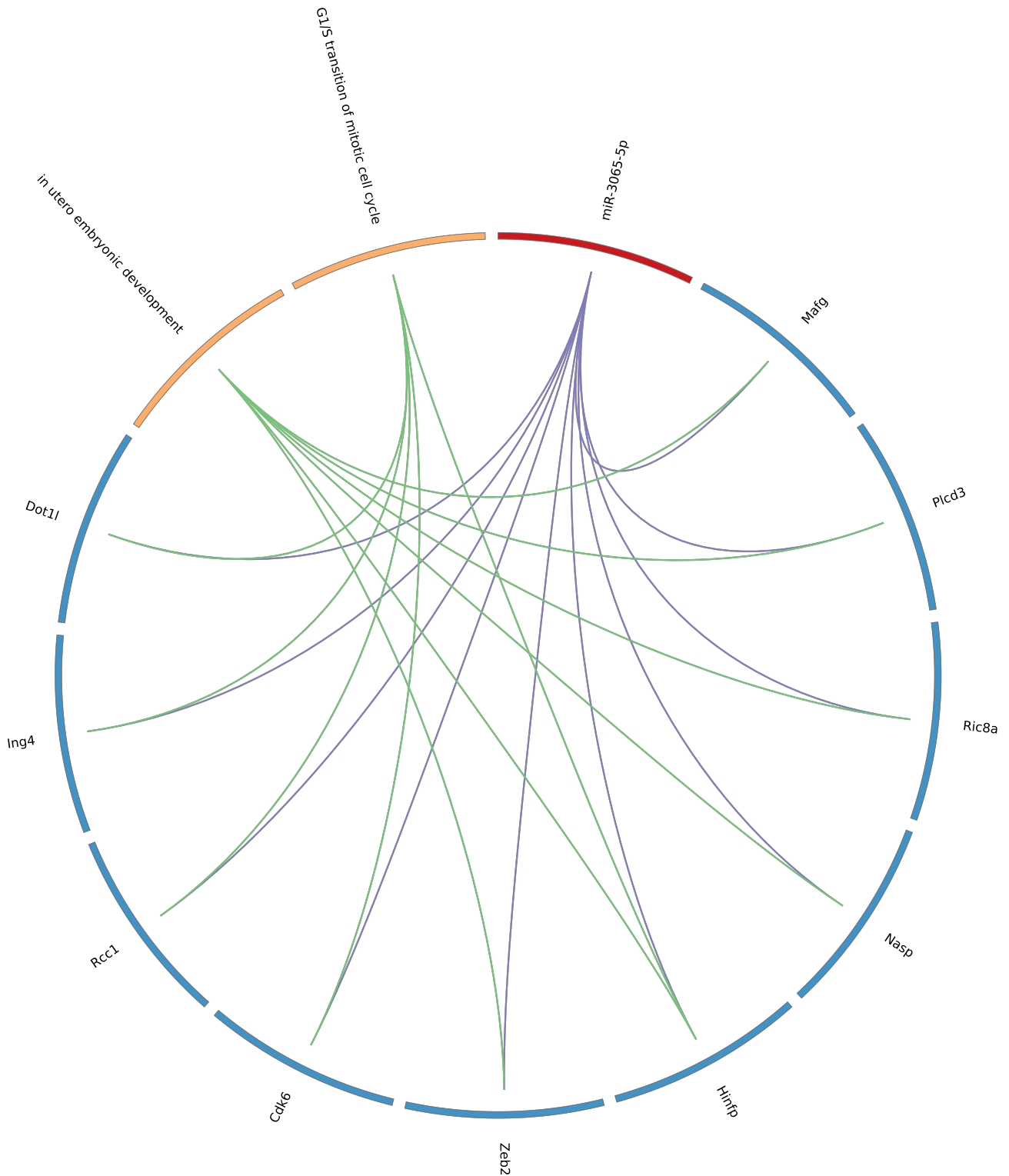


Figure 9 : Circos plot representing the predictive mRNA targets of enriched/depleted miRNAs in the hippocampus, and their associated GO terms.

Target predictions were performed with Targetscan and GO terms analysis was done on the top 50 predictive mRNA targets with the Metascape software. The colors correspond to the following : red : miRNAs, blue : predictive target genes ; orange : GO terms, purple : link between miRNAs and predictive target genes ; green : link between genes and their associated GO terms.

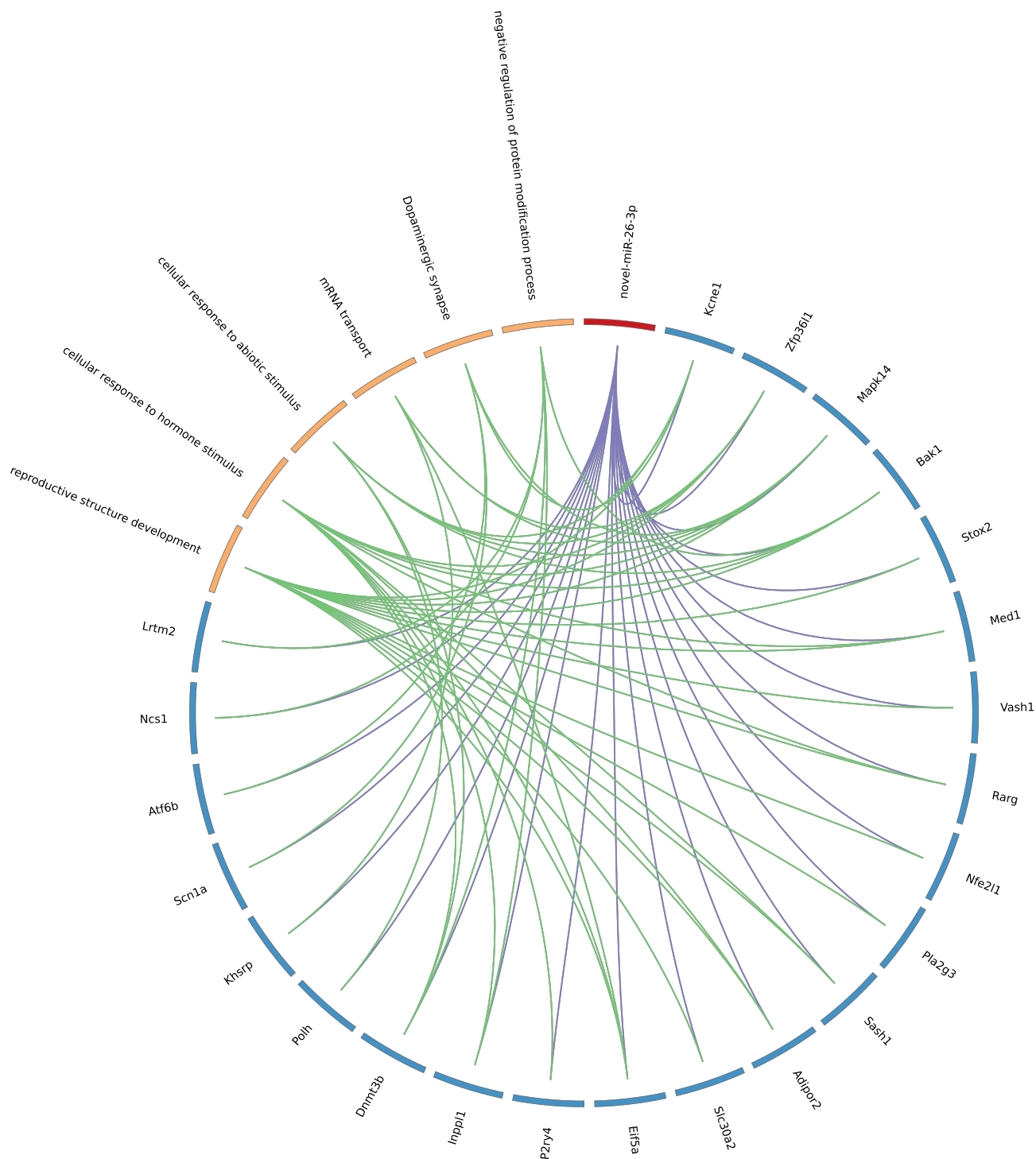


Figure 10 : Circos plot representing the predictive mRNA targets of enriched/depleted miRNAs in the striatum, and their associated GO terms.

Target predictions were performed with Targetscan and GO terms analysis was done on the top 50 predictive mRNA targets with the Metascape software. The colors correspond to the following : red : miRNAs, blue : predictive target genes ; orange : GO terms, purple : link between miRNAs and predictive target genes ; green : link between genes and their associated GO terms.

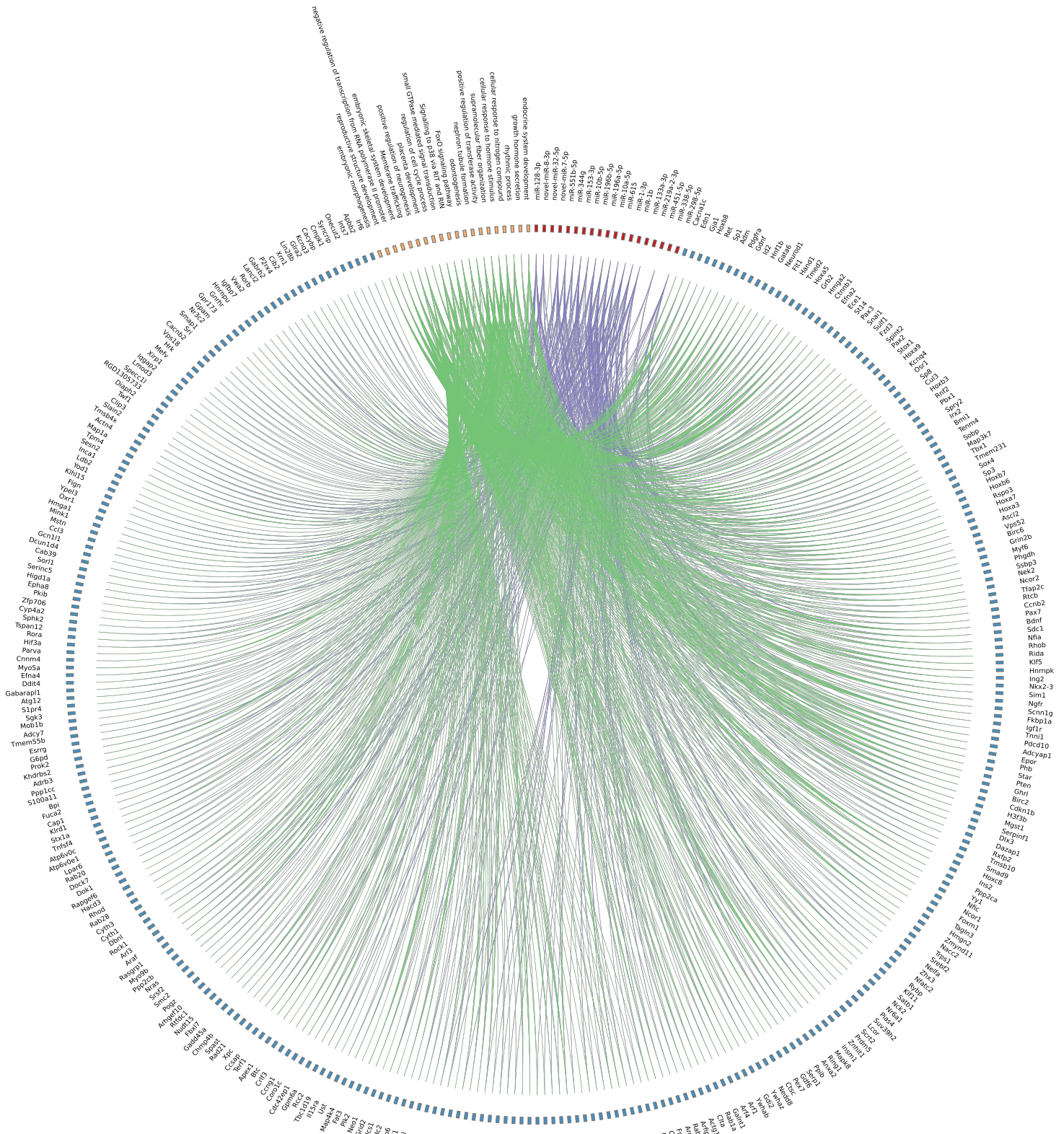


Figure 11 : Circos plot representing the predictive mRNA targets of enriched/depleted miRNAs in the spinal cord, and their associated GO terms.

Target predictions were performed with TargetsScan and GO terms analysis was done on the top 50 predictive mRNA targets with the Metascape software. The colors correspond to the following : red : miRNAs, blue : predictive target genes ; orange : GO terms, purple : link between miRNAs and predictive target genes ; green : link between genes and their associated GO terms.

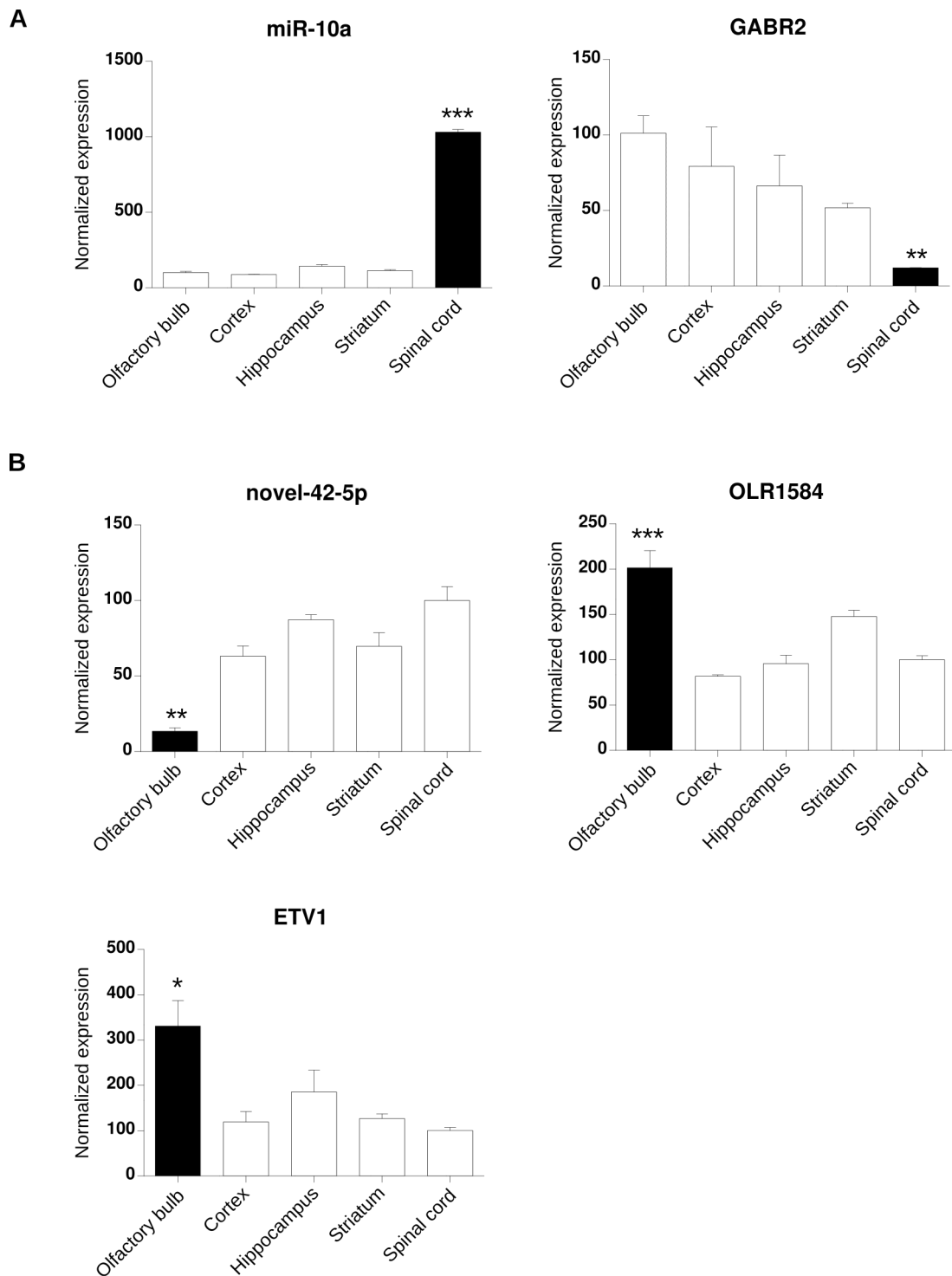
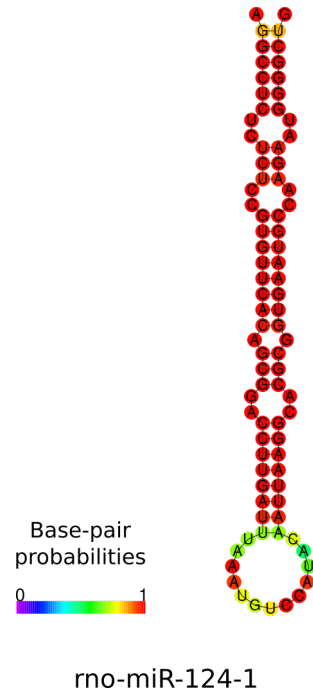


Figure 12 : Analysis of the expression of specific miRNAs and their putative mRNA targets by RT-qPCR.

A : Expression of miR-10a and its putative target GABR2 per structure. miR-10a is specifically enriched in the spinal cord and one of its putative targets, GABR2, is significantly down-regulated in the spinal cord. Expression is normalized by the olfactory bulb's one. **B** : Expression of novel-miR-42-5p and its putative targets OLR1584 and ETV1 per structure. miR-novel-42-5p is specifically depleted in the olfactory bulb and two of its targets OLR1584 and ETV1 are significantly over-expressed. Expression is normalized by the spinal cord's one. Anova and post-hoc bonferroni test had been performed, p-value<0.005.

Supplemental figures



Supplemental Figure 1: Predictive structure of rno-miR-124-1.

It has been performed with RNAfold program. Colors represent the probability of matching between the bases.

Tables

Name of the novel miRNA	Number of copies	Chromosomal location	number of chromosomes
rno-novel-miR-2-5p	6	2 x chr 1 ; chr 7 ; chr 12 ; chr 15 ; chr 18	5
rno-novel-miR-8-3p	3	3 x chr 1	1
rno-novel-miR-12-5p	3	chr 2 ; 2 x chr 4	2
rno-novel-miR-19-5p	2	chr 3 ; chr 20	2
rno-novel-miR-22-5p	5	chr 3 ; 2 x chr 5, chr 6 ; chr 7	4
rno-novel-miR-26-3p	2	chr 18 ; chr 5	2
rno-novel-miR-52-3p	2	chr 10 ; chr 11	2
rno-novel-miR-66-5p	2	chr 12 ; chr 14	2

Table 1: Chromosomal organization of the novel miRNAs.

Duplicated miRNAs are localized either on the same chromosome or on different chromosomes

novel rat miRNAs		Mouse orthologs		Human orthologs	
name	sequence	name	sequence	name	sequence
mo-novel-miR-7-5p	AGUCAGGCUACUGGUUAUUUCCA	mmu-miR-344-5p	AGUCAGGCUCCUGGCUAGAUUCCAGG	N/A	N/A
mo-novel-miR-8-3p	GGUUAUACCAAAGCCCGACUGA	mmu-miR-344h-3p	GGUUAUACCAAAGCCCGACUGU	N/A	N/A
mo-novel-miR-14-3p	UCUCUGGGCCUGUGUCUU	mmu-miR-330-5p	UCUCUGGGCCUGUGUCUJAGGC	hsa-miR-330-5p	UCUCUGGGCCUGUGUCUJAGGC
mo-novel-miR-24-5p	UCAAGAGCAAUACGAAAA	mmu-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUACGAAAAUUGU	hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUACGAAAAUUGU
mo-novel-miR-35-5p	UUUCCUCUCUGCCCAUAGGGU	mmu-miR-3059-5p	UUUCCUCUCUGCCCAUAGGGU	N/A	N/A
mo-novel-miR-37-3p	GCAGGAACUUGAGAGUCU	mmu-miR-873a-5p	GCAGGAACUUGAGAGUCUCU	hsa-miR-873-5p	GCAGGAACUUGAGAGUCUCU
mo-novel-miR-38-5p	ACUCUAGCUGCCAAGGCGCU	mmu-miR-1251-5p	ACUCUAGCUGCCAAGGCGCU	hsa-miR-1251-5p	ACUCUAGCUGCCAAGGCGCU
mo-novel-miR-56-5p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAG	mmu-miR-378c	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGC	hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC
mo-novel-miR-64-5p	CUAAGGCAGGCAGACUUCAGUGU	mmu-miR-6540-5p	CUAAGGCAGGCAGACUUCAGUG	N/A	N/A
mo-novel-miR-72-3p	CCAGUAUUGACUGUCUGCGAA	mmu-miR-16-1-3p	CCAGUAUUGACUGUCUGCGA	hsa-miR-16-1-3p	CCAGUAUUGACUGUCUGCGA
mo-novel-miR-87-5p	GUUCCUGCUAAGCAGCCAGU	mmu-miR-3074-5p	GUUCCUGCUAAGCAGCCAGU	hsa-miR-3074-5p	GUUCCUGCUAAGCAGCCAGC
mo-novel-miR-90-5p	AGGUCCUCAGUAAGUAUUUGUU	mmu-miR-1264-5p	AGGUCCUCAGUAAGUAUUUGUU	N/A	N/A

Table 2: Some novel miRNAs have orthologous sequences in human and/or mouse genomes.

Novel-miRNAs with their corresponding orthologous sequences in mouse and/or human. We defined as ortholog a miRNA sequence with a minimum of 95 % similarities with a miRNA from another species.

novel rat miRNAs		Mouse « functional » orthologs		Human « functional » orthologs	
name	sequence	name	sequence	name	sequence
mo-novel-miR-78-5p	UGCCCCUGCUGAGGCUUGUCU	mmu-miR-3070-5p	AGCCCCUG ACCUUGAACCUUGGGA	N/A	N/A
mo-novel-miR-79-3p	UUAGGACUCUGGUCAUCUUUGG	N/A	N/A	hsa-miR-3117-3p	AUAGGACUC AUAUAGUGCCAG
mo-novel-miR-60-5p	CAGGGAGAGAACUAGUACAG	N/A	N/A	hsa-miR-6760-5p	CAGGGAGA AGGUGGAAGUCAGA
mo-novel-miR-86-3p	ACAGACUGGUGCCUGGUGUGG	N/A	N/A	hsa-miR-4494	CCAGACUG UGGUGUACAGAGG
mo-novel-miR-63-5p	GCCUGAGAGCUGGGGGUA	N/A	N/A	hsa-miR-4324	CCUGAGA CCCUAACCUUAA
mo-novel-miR-21-5p	CCGUCCUGUACUGCAGCA	mmu-miR-676-3p	CCGUCCUG AGGUUGUUGAGCU	hsa-miR-676-3p	CCGUCCUG AGGUUGUUGAGCU
mo-novel-miR-54-3p	UGUGUCUUUCUCCUCUUGAC	N/A	N/A	hsa-miR-4711-3p	CGUGUCUU UGGCUUGAU
mo-novel-miR-57-3p	CUCUACCUCCCGUCUCCACA	N/A	N/A	hsa-miR-1229-3p	CUCUACCA CUGCCUCCACAG
mo-novel-miR-48-5p	AUGGCGGCGUGAGUCUG	N/A	N/A	hsa-miR-6770-3p	CUGGCGGCGU GUCUUCACAG
mo-novel-miR-84-5p	CUGUGGGCUGCAGGAGGAC	mmu-miR-134-3p	CUGUGGGC CACCUAGUCACC	hsa-miR-134-3p	CUGUGGGC CACCUAGUCACC
mo-novel-miR-80-3p	CCCAGGAGCUGUAAGGCGG	mmu-miR-7226-5p	GCCAGGGA AGUAGUUGUGAAGGG	N/A	N/A
mo-novel-miR-59-3p	UCCCCUGGGUCUGUCUGCA	mmu-miR-331-3p	GCCCCUGGG CUAUCCUAGAA	hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGG CUAUCCUAGAA
mo-novel-miR-25-3p	GCGGGCGGGCGGAGGCG	mmu-miR-5126	GCGGGCGGG GCCGGGGCGGGG	N/A	N/A
mo-novel-miR-3-3p	AUAAGUGUAGAGAGUCUUGU	mmu-miR-668-5p	GUAAGUGU GCCUCGGUGAGCAUG	N/A	N/A
mo-novel-miR-71-5p	CUCCUCUAGUCCUCUUGUUGU	N/A	N/A	hsa-miR-642a-5p	GUCCUCU CCAAAUGUGUCUUG
mo-novel-miR-9-3p	CUGGGCGGGAUGGAGGUGG	N/A	N/A	hsa-miR-1228-5p	UGGGCGGG GGCAGGUGUGUG
mo-novel-miR-17-5p	GCAAGGCCAGCGAGUGACU	N/A	N/A	hsa-miR-3922-5p	UCAAGGCC AGAGGUCCACAGCA
mo-novel-miR-41-5p	UCCGGGCGCGGGGAUGA	mmu-miR-673-3p	UCCGGGCGCG AGUUCUGGCAACC	N/A	N/A
mo-novel-miR-32-5p	ACUCGGAUCAAGCUGAGGCCA	mmu-miR-6336	UCUCGGAU UAGUAAGAGAUC	N/A	N/A
mo-novel-miR-49-5p	ACUCUCUCACUCUGCAUGGUUA	N/A	N/A	hsa-miR-7110-3p	UCUCUCU CCCAUCCUGCAG
mo-novel-miR-73-3p	UGGAGGAGAAAAAGAGA	N/A	N/A	hsa-miR-765	UGGAGGAGA AGGAAGGUGAUG
mo-novel-miR-77-5p	AGUUUUCUGCCUUCUCUCUGUGG	mmu-miR-7214-5p	UGUUUUCUG GGUUGGAAUAGAGAA	N/A	N/A
mo-novel-miR-10-3p	AUUCUUCACAGUGGGCUAGA	mmu-miR-6946-3p	UUUCUUCU CUUCCUUCACAG	N/A	N/A

Table 3: novel-miRNAs with their corresponding functional orthologous sequences in mouse and/or human.

Functional orthologous sequences were determined with a perfect homology into the seed region. Sequences highlighted in orange are seed regions.

3. Discussion et perspectives.

Notre travail a consisté à étudier le miRnome de 5 structures importantes du SNC : le cortex, l'hippocampe, le striatum, le bulbe olfactif et la moelle épinière, en utilisant la technologie de RNA-Seq. Cette technologie nous a permis : **1)** de découvrir l'expression de nouvelles espèces de miARNs et **2)** de révéler l'existence d'un patron d'expression des miARNs spécifiques de chacune des structures. Ces résultats laissent supposer que les miARNs sont à la base de la particularité transcriptomique qui fait la spécificité des ces structures du SNC.

3.1. Le RNA-Seq permet la découverte de nouvelles espèces de miARNs.

Nous avons choisi d'étudier le miRnome du SNC par RNA-Seq, pour bénéficier de l'avantage de cette technologie qui permet de découvrir de nouvelles espèces de miARNs. Pour cela, nous avons utilisé l'algorithme miRPro (Shi et al., 2015), qui s'appuie largement sur l'algorithme cœur de miRDeep2 (Friedländer et al., 2012). La grande différence entre ces deux programmes est que miRPro : **1)** a amélioré la spécificité des paramètres de découverte des nouveaux miARNs, **2)** il permet une annotation homogène des nouveaux miARNs dans l'ensemble des échantillons étudiés.

Malgré les améliorations apportées au programme miRPro dans la détection de nouveaux miARNs, la quantité de faux-positifs reste conséquente. En effet, miRPro a initialement proposé 8500 séquences de nouveaux miARNs. Nous avons réduit ce nombre à moins d'une centaine de séquences en appliquant des filtres supplémentaires : **1)** un nombre de lectures supérieur à 1 cpm (*count per million of sequences*), **2)** la présence du miARN dans au moins deux réplicats biologiques d'une même structure. Cela prouve qu'il reste un travail important à faire dans le développement de nouveaux outils bioinformatiques dédiés à l'analyse des échantillons de RNA-Seq, et à la prédiction des nouveaux miARNs. A ce propos, un nouvel outil a été développé cette année : miRCat2 (Paicu et al., 2017). Ce dernier est annoncé comme étant plus précis que miRDeep2 dans la prédiction des nouveaux miARNs, dans des échantillons issus à la fois des plantes et des animaux. Il serait intéressant de prendre le temps de tester ce programme sur nos échantillons et de le comparer à miRPro.

D'autre part, la prédiction des nouveaux miARNs par miRPro se base sur la biogénèse des miARNs. Plus spécifiquement elle repose sur la reconnaissance de la taille et de la structure du pre-miARN, et de la dernière étape de maturation réalisée par l'enzyme Dicer. Néanmoins, de plus en plus de démonstrations proposent l'existence de voies de biogénèse des miARNs non canoniques. Ces voies de biogénèse outre-passent un ou plusieurs acteurs clés de la voie canonique, comme le microprocesseur ou bien DICER. En particulier, les nouveaux miARNs qui utilisent des voies de biogénèse indépendantes de la maturation par l'enzyme DICER, comme les simtrons (Havens et al., 2012) ou les agotrons (Hansen et al., 2016) posent de réels problèmes de prédiction par les programmes bioinformatiques, qui mettent au centre les caractéristiques dues à l'étape de maturation par DICER. Par conséquent, ces miARNs sont classés dans la catégorie des faux positifs par les algorithmes. Cela signifie que nous passons sûrement à côté de la découverte de certains nouveaux miARNs pertinents.

Par ailleurs, la prédiction de nouveaux miARNs issus des analyses bioinformatiques d'échantillons de RNA-Seq ne suffit pas à prouver leur existence réelle. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, tenté d'amplifier par PCR certains nouveaux pre-miARNs à partir des échantillons initiaux. Nous avons ensuite fait migré les amplifiats sur gel d'agarose dans le but de révéler leur présence. Le séquençage de ces produits de PCR n'a pas bien fonctionné, certainement car les nouveaux pre-miARNs sont présents en faible quantité. Dans un second temps, nous avons cloné les amplifiats de PCR (pour les précurseurs) et de RT qPCR (pour les séquences matures) dans le plasmide pjet, afin de les séquencer. Le séquençage est en cours de réalisation.

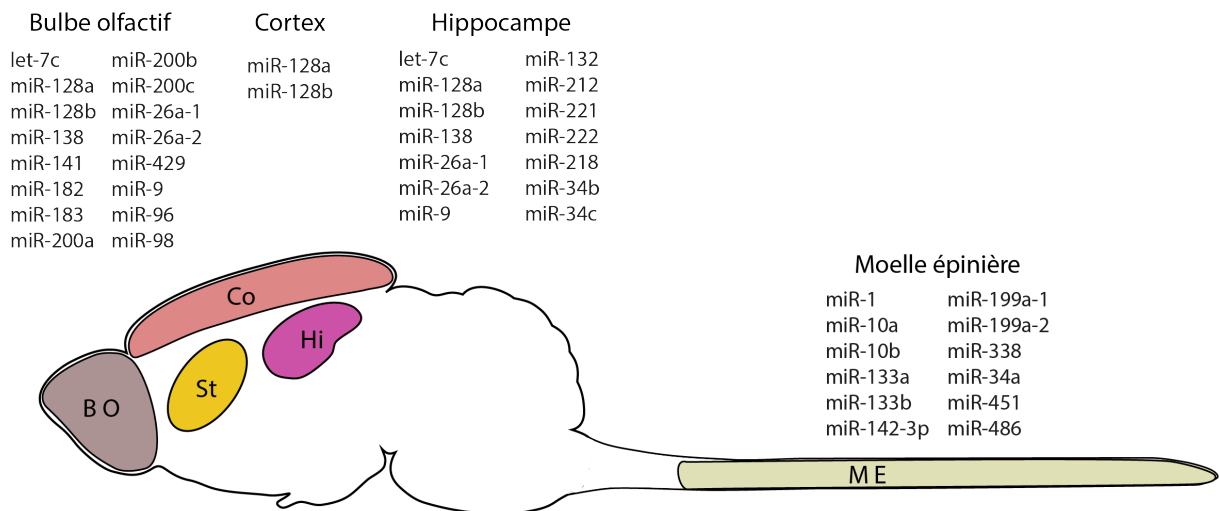
Nous avons essayé d'analyser la présence d'isomiRs dans nos échantillons. Les résultats de ces analyses ne sont pas concluants, car nous ne sommes pas en mesure de savoir si l'isomiR proposé en est réellement un, ou bien si la modification est due à une erreur de séquençage. Toutefois, il serait intéressant de poursuivre les analyses, par exemple en utilisant un algorithme spécialisé dans cette analyse.

3.2. Les miARNs, la signature de la spécificité du transcriptome des structures du SNC.

Notre travail montre une différence significative de l'expression de certains miARNs entre les différentes structures du SNC étudiées. De manière intéressante, dans le bulbe olfactif et dans la moelle épinière, nos résultats sont en concordance avec la

littérature (Figure 20). Cela renforce l'hypothèse selon laquelle les miARNs sont importants pour la détermination de la physiologie des régions cérébrales. D'autre part, notre étude met en exergue l'enrichissement de deux nouveaux miARNs : le novel-miR-47-5p dans le bulbe olfactif, et le novel-miR-26-3p dans le striatum. Nous avons déjà identifié deux gènes cibles de ces miARNs par prédiction bioinformatique, et corrélation d'expression par RT qPCR. Il serait intéressant de confirmer ces résultats et de rechercher d'autres cibles afin de déterminer leur rôle physiologique.

A: Synthèse de la littérature



B: Résultats expérimentaux de notre étude

Bulbe olfactif		Striatum	Moelle épinière	
miR-429	miR-301b-3p	novel-miR-26-3p	miR-10b-5p	miR-133a-3p
miR-200b-3p	novel-miR-47-5p		miR-196b-5p	miR-219a-2-3p
miR-141-3p	miR-224-5p		miR-196a-5p	miR-451-5p
miR-200a-3p	miR-375-3p		miR-10a-5p	miR-338-5p
miR-96-5p	miR-130b-5p		miR-615	miR-298-5p
miR-200c-3p	miR-135b-5p		miR-1-3p	
miR-183-5p	miR-205			
miR-182	miR-211-5p			
	miR-490-5p			

Figure 20 : Comparaison des miARNs enrichis avec la littérature.

A : Synthèse de la littérature. Récapitulatif des miARNs qui sont trouvés enrichis dans les structures d'intérêt chez les rongeurs. **B : Résultats expérimentaux de notre étude.** Récapitulatif des miARNs que l'on trouve enrichis (4 fois plus exprimés, et *p-value* <0,05) dans les structures. Les miARNs notés en gras sont ceux que notre étude confirme par rapport à la littérature existante.

Nos résultats nous laissent penser que les miARNs jouent un rôle crucial dans la détermination de la spécificité transcriptomique des structures du SNC. Pour le vérifier, nous souhaitons dans un premier temps réaliser une analyse de RNA-Seq sur les ARNm à

partir des échantillons de départ. Cela nous permettra de réaliser une corrélation entre l'expression des miARNs et des ARNm pour chacune des structures. Ensuite, nous souhaitons valider cette corrélation en réalisant une étude de protéomique (spectométrie de masse et western blot). Nous pensons que l'ensemble de l'analyse nous permettra de conclure sur l'importance des miARNs dans la détermination de la particularité transcriptomique des structures du SNC.

Ensuite, il nous semble indispensable de vérifier l'interaction effective entre les miARNs et les ARNm. Pour cela, nous proposons de vérifier les corrélations issues des analyses de RNA-Seq des miARNs et des ARNm, en utilisant la méthode de CLIP-Seq (*cross-linking and immunoprecipitation followed by next-generation sequencing*), souvent utilisée pour compléter les résultats de RNA-Seq (Hafner et al., 2010; Licatalosi et al., 2008; Spitzer et al., 2014). Cette méthode consiste à attacher de manière permanente les ARNs et les protéines qui interagissent entre eux. Ensuite, le complexe est purifié à l'aide d'une immunopurification dirigée contre la molécule d'intérêt. Dans ce cas là ce sera contre l'une des protéines AGO, protéine clé du complexe RISC. Enfin, les séquences d'ARN seront lues par séquençage. Cette technique nous permettra de valider l'interaction prédictive entre les miARNs et les ARNm. Finalement, nous validerons la régulation transcriptionnelle par les miARNs à l'aide d'un test rapporteur luciférase.

Enfin, il serait intéressant d'évaluer l'importance d'un miARN ou d'un groupe de miARNs sur la physiologie d'une structure. Pour cela, nous pouvons envisager d'exprimer dans une structure des miARNs qui sont basalement non exprimés, ou au contraire d'inhiber ou de supprimer l'expression de miARNs très représentés. Nous pouvons imaginer d'évaluer l'effet de ces paramètres sur la morphologie, le transcriptome, et la physiologie de la structure d'intérêt. Cela permettrait de valider l'importance jouée par les miARNs sur la détermination et la physiologie des structures du SNC.

3.3. Comment expliquer la différence d'expression des miARNs entre les structures du SNC ?

Suite à notre étude, la question que l'on peut se poser est de savoir comment est régulée l'expression des miARNs entre les différentes structures du SNC. Nous proposons 3 hypothèses pour y répondre.

Une première hypothèse est que la régulation s'effectue au niveau de la transcription du miARN. Il se peut que selon la région d'intérêt, le gène du miARN soit accessible ou non par les facteurs de transcription et les ARNs polymérases. Nous proposons de le vérifier en réalisant des expériences de CHIP (*chromatin immunoprecipitation*) pour comparer l'état de la chromatine des gènes de miARNs qui sont différentiellement exprimés entre les structures.

Une seconde hypothèse est que la stabilité des miARNs matures est variable selon les structures. Cela peut s'expliquer par la présence particulière d'enzymes de dégradation, ou bien d'enzymes qui modifient la séquence du miARN mature, le rendant très stable, comme l'uridylation et l'adénylation. L'ajout de ces molécules doit pouvoir s'analyser à partir des fichiers de RNA-Seq que nous avons, et il serait intéressant de le faire.

Une troisième hypothèse est que les miARNs peuvent être séquestrés par les ARNs circulaires (ciARNs), limitant leur action régulatrice sur les ARNm cibles. Il serait donc intéressant d'évaluer la corrélation d'expression entre les miARNs et les ciARNs à travers les différentes structures du SNC. Néanmoins, dans le cas où cette hypothèse est vérifiée, cela ne fait que reporter la question sur comment les ciARNs sont différentiellement exprimés entre les régions du SNC.

En conclusion, notre travail apporte une vision globale de l'expression des miARNs, connus et nouveaux, dans 5 structures fondamentales du SNC : le cortex, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le striatum et la moelle épinière. Il montre aussi que les miARNs sont différentiellement exprimés entre les structures. Ainsi, ce travail permet de s'interroger sur la place que tiennent les miARNs quant à la spécification des structures du SNC.

CHAPITRE 3

Les microARNs sont échangés entre les cellules du système nerveux via les vésicules extracellulaires, et sont impliqués dans les mécanismes de régulation de la plasticité neuronale.

Chapitre 3 : Les miRNAs sont échangés entre les cellules du système nerveux via les vésicules extracellulaires, et sont impliqués dans les mécanismes de régulation de la plasticité neuronale.

1. Introduction

1.1. Les vésicules extracellulaires.

1.1.1. L'histoire de la découverte des vésicules extracellulaires.

La présence de vésicules extracellulaires (EVs) délimitées par une membrane close a été rapportée depuis les années 1970 dans les fluides biologiques, comme par exemple dans le sang (Crawford, 1971). Leur libération était considérée comme se réalisant uniquement par le bourgeonnement de la membrane plasmique (Colombo et al., 2014). Cependant, dans les années 1980, une voie de libération plus complexe a été décrite par deux équipes indépendantes, qui s'intéressaient à la maturation des réticulocytes. Celle-ci concerne la fusion du corps multivésiculaire (MVB pour *multivesicular body*), qui contient des petites vésicules internes dans sa lumière, avec la membrane plasmique (Harding et al., 1983; Pan and Johnstone, 1983). Ces vésicules d'origine endosomale, et libérées dans le milieu extracellulaire, ont par la suite été nommées exosomes (Johnstone et al., 1987). L'existence de cette voie de biogénèse et de libération des exosomes a été confirmée dans d'autres types cellulaires, comme les cellules immunitaires (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998), les cellules épithéliales (van Niel et al., 2001), les cellules musculaires (Forterre et al., 2014) ou encore les cellules tumorales (Wolfers et al., 2001). Aujourd'hui, la communauté scientifique pense que tous les types de cellules des métazoaires libèrent des exosomes, et que ce processus existe aussi chez les plantes (Robinson et al., 2016) et les bactéries (Beer and Wehman, 2017).

Les vésicules extracellulaires (EVs) ont longtemps été considérées comme un moyen pour la cellule de se débarrasser facilement de molécules. Cependant, de nombreux résultats montrent maintenant qu'elles permettent aux cellules de communiquer entre elles et d'échanger des molécules, et ceci a donné naissance à un nouveau paradigme : les

vésicules extracellulaires, une nouvelle voie de communication intercellulaire (Colombo et al., 2014; Tkach and Théry, 2016; Valadi et al., 2007).

1.1.2. Les différents types de vésicules extracellulaires.

Plusieurs sous-types d'EVs ont été caractérisés, dont certains sont associés à l'état pathologique de la cellule, comme les corps apoptotiques chez les cellules qui meurent et les oncosomes chez les cellules tumorales (Maas et al., 2017).

Classiquement, les EVs sont divisées en deux grandes catégories:

- Les **exosomes**, qui ont une taille comprise entre 40 et 150 nm, et qui sont libérés par la fusion du corps multivésiculaire avec la membrane plasmique ;
- Les **microvésicules** (encore appelées ectosomes), qui ont une taille de 200 à 500 nm et qui proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique.

Dans ce travail, les différents termes seront employés : EVs, exosomes et microvésicules. Le terme EVs sera utilisé pour désigner l'ensemble des deux catégories, et les termes exosomes et microvésicules désigneront respectivement la sous-catégorie de vésicules spécifique lorsque celle-ci aura été ouvertement caractérisée ou nommée dans le travail décrit.

Comme évoqué, la distinction majeure entre les exosomes et les microvésicules s'effectue par leur voie de biogénèse. Ainsi, leurs voies de synthèse respectives vont être décrites en détail.

1.2. La biogénèse des vésicules extracellulaires.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la biogénèse des exosomes et des microvésicules sont distincts, cependant ils impliquent tous les deux une courbure de la membrane lipidique, de l'endosome tardif pour les exosomes ou de la membrane plasmique pour les microvésicules.

1.2.1. La biogénèse des exosomes.

La biogénèse des exosomes s'intègre dans la voie endosomale, qui permet de recycler et dégrader les molécules situées à la membrane plasmique. Les molécules à

recycler sont redirigées vers la membrane plasmique dans les endosomes de recyclage (Grant and Donaldson, 2009; Morelli et al., 2004), alors que les molécules à éliminer sont sélectivement envoyées vers la voie de dégradation qui conduit au lysosome (Stoorvogel et al., 1991). Dans cette voie, l'endosome précoce mature, puis sa membrane s'invagine vers l'intérieur, libérant des vésicules intraluminales, et créant le corps multivésiculaire (MVB). A ce stade, soit le MVB se dirige vers la voie de dégradation et fusionne avec le lysosome, soit il se dirige vers la voie de sécrétion et fusionne avec la membrane plasmique, libérant les vésicules intraluminales (ILVs) dans le milieu extérieur, qui sont alors nommées exosomes (Grant and Donaldson, 2009) (Figure 21).

Plusieurs mécanismes sont décrits pour la biogénèse des exosomes, et le plus caractérisé est celui qui implique le recrutement du complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required transport*). Celui-ci intervient lors de la création des vésicules intraluminales du MVB.

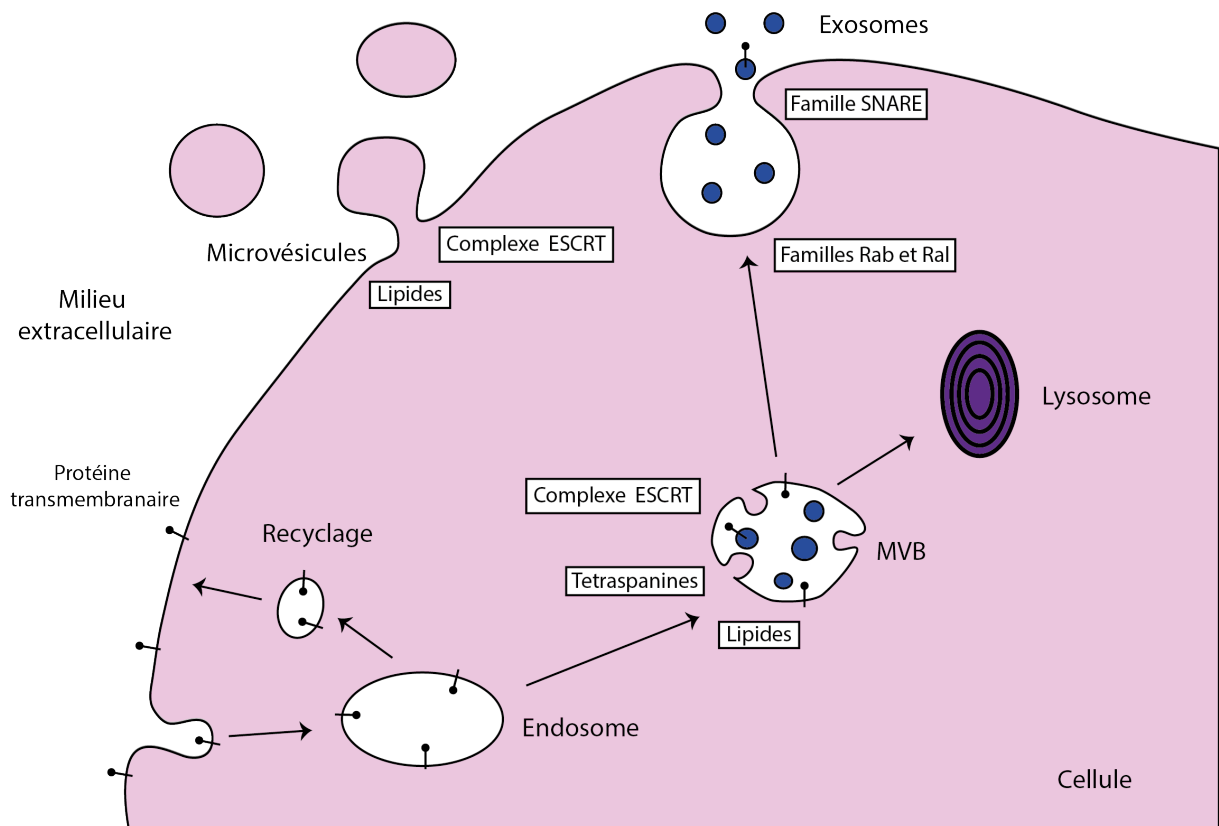


Figure 21: Représentation schématique de la biogénèse des exosomes et des microvésicules, avec les principaux acteurs moléculaires.

La biogénèse des exosomes dépend de la voie endosomale. Les exosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire par la fusion du MVB avec la membrane plasmique. Les microvésicules résultent du bourgeonnement de la membrane plasmique. Cette figure est largement inspirée de : (Kowal et al., 2014).

1.2.1.1. La création du MVB via la machinerie ESCRT.

La formation des vésicules intraluminales du MVB est le point de départ de la biogénèse des exosomes (Abels and Breakefield, 2016). Dans un premier temps, la membrane de l'endosome tardif est réorganisée et présente des régions très riches en tétraspanines, et en particulier CD9 et CD63 (Pols and Klumperman, 2009). Ensuite, le complexe ESCRT est recruté sur les sites de formation des ILVs (Colombo et al., 2013; Wollert and Hurley, 2010), et provoque l'invagination de la membrane vers la lumière, et la scission de la vésicule.

Le système ESCRT est composé de 5 complexes de protéines : ESCRT 0, I, II, III, et Vps4 ainsi que de protéines accessoires (Tableau 5). Les complexes s'assemblent séquentiellement dans le but de créer les ILVs dans le MVB (Henne et al., 2011) (Figure 22) en reconnaissant des protéines cargos ubiquitinylées.

Tableau 5: Présentation des sous-unités de la machinerie ESCRT et leurs fonctions associées.

Activité ESCRT	Protéines chez les métazoaires	Rôle biochimique
ESCRT-0		
Regroupement des cargos à internaliser	HRS (HGS) STAM1, STAM2	Interaction avec la phosphatidyl inositol 3-P, ESCRT-I l'ubiquitine et la clathrine. Interaction avec l'ubiquitine.
ESCRT-I		
Bourgeonnement de la membrane (avec ESCRT-II)	VPS23 (TSG101) VPS28 VPS37A, B, C et D MVB12A, MVBB	Interaction avec l'ubiquitine et ESCRT-0. Interaction avec ESCRT-II. Interaction avec les membranes. Stabilisation des oligomères d'ESCRT-I et interaction avec l'ubiquitine.
ESCRT-II		
Bourgeonnement de la membrane (avec ESCRT-I)	VPS22 (EAP30) VPS25 (EAP20) VPS36 (EAP45)	Interaction avec les membranes. Recrutement de ESCRT-III via l'interaction avec VSP20. Interaction avec les membranes, l'ubiquitine et ESCRT-I.

ESCRT-III		
Scission de la membrane	VPS20 (CHMP6)	Initiation de l'assemblage de ESCRT-III et de la scission.
	SNF7A (CHMP4A) SNFB (CHMP4B)	Acteur principal de la scission membranaire, interaction avec Alix.
	VPS24 (CHMP3)	Terminaison de la scission membranaire.
	VPS2A (CHMP2A) VPS2B (CHMP2B)	Recrutement de Vsp4 et initiation de la dissociation de ESCRT-III.
Vps4-Vta1		
Désassemblage de ESCRT-III	ALIX (AIP1)	

Ce tableau est adapté de : (Hurley and Hanson, 2010).

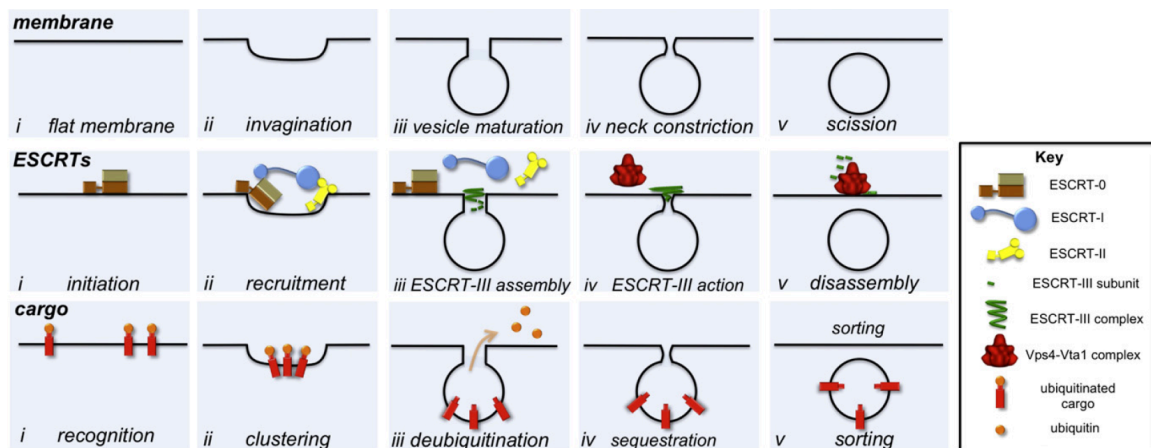


Figure 22: Mode d'action du complexe ESCRT dans la création des ILVs du MVB.

Le haut du schéma représente le point de perspective de la membrane de l'endosome tardif lors de la création des vésicules intraluminales. Séquentiellement, la membrane s'invagine, la vésicule se crée et mature, le cou de la vésicule est comprimé, puis la vésicule est libérée. Le milieu du schéma représente les étapes d'intervention du complexe ESCRT. ESCRT-0 reconnaît le site de formation en particulier grâce à l'enrichissement de la membrane en protéines ubiquitinylées, et engage le recrutement d'ESCRT-I et ESCRT-II. Ensuite, ESCRT-II permet l'assemblage de ESCRT-III, qui entraîne l'invagination de la membrane. Ce dernier est désassemblé par le complexe Vsp4-Vta1. Le bas du schéma représente le point de perspective des cargos chargés dans les ILVs. Le complexe ESCRT-0 reconnaît les ubiquitines des cargos. Les complexes ESCRT-0, -I et -II réunissent les cargos et les regroupent. ESCRT-III recrute la machinerie de dé-ubiquitinylation et empaquète les cargos au cœur de la vésicule. Ces derniers seront finalement transportés à l'intérieur de la vésicule. Source : (Henne et al., 2011).

1.2.1.2. Les autres acteurs de la formation des MVBs.

Alors que l'implication de la machinerie ESCRT a été largement étudiée dans la création du MVB, une étude réalisée dans des cellules de mammifères démontre que la déplétion des composants cœur de ESCRT altère la morphologie des composants de la voie endosomale, mais n'entraîne pas de diminution de la libération des exosomes. Ce travail propose que plusieurs mécanismes, dépendants et indépendants de ESCRT, coexistent (Stuffers et al., 2009) dans la formation des MVBs et donc des exosomes. Plus particulièrement, avec l'inactivation des composants de la machinerie ESCRT, les MVBs qui contiennent la tétraspanine CD63 continuent d'être créés (Stuffers et al., 2009), ce qui suggère que cette dernière pourrait jouer un rôle dans la biogénèse des MVBs, dans un mécanisme indépendant du recrutement de la machinerie ESCRT. A ce propos, le travail de Van Niel et de ses collaborateurs démontre, dans une lignée de cellules de mélanocytes humaines, que la tétraspanine CD63 est un facteur essentiel qui participe à la création des ILVs du MVB. Cela permet finalement d'initier la création des fibrilles amyloïdes dans les processus de mélanogénèse (van Niel et al., 2011).

Une autre étude montre que le LBPA (acide lysobisphosphatidique) est capable d'induire l'invagination de la membrane de liposomes conduisant à la création de vésicules à l'intérieur de ces derniers. De façon très intéressante, le LBPA n'a été détecté que dans la membrane des endosomes tardifs, ce qui laisse envisager la possibilité qu'ils puissent déformer leur membrane et créer des vésicules intraluminales (Matsuo et al., 2004), et ainsi participer à la biogénèse des exosomes. D'autre part, cette même étude montre que la protéine ALIX interagit avec le LBPA, et régule la formation des vésicules, suggérant l'importance d'Alix dans la formation des exosomes.

Par ailleurs, le travail de Baietti et de ses collaborateurs montre que la protéine ALIX, dans une lignée cellulaire cancéreuse, est un régulateur important de la formation des ILVs à travers son interaction avec le complexe syndécane-synténine (Baietti et al., 2012). La protéine ALIX a également comme partenaire le complexe ESCRT-III (Tableau 5), l'un des acteurs majeurs dans la formation des ILVs dans le MVB. Les auteurs proposent donc que le mécanisme est en partie dépendant du recrutement des composants du complexe ESCRT via ALIX au sein du complexe ALIX-SYNDECANE-SYNTENINE. Le complexe ALIX-SYNDECANE-SYNTENINE est lui-même contrôlé par ARF6, une

GTPase, et son partenaire PLD2 (la phospholipase D2), qui régulent la synténine, et ainsi contrôlent la formation des ILVs (Ghossoub et al., 2014).

Un mécanisme alternatif, étudié dans une lignée de cellules d'oligodendrocytes de souris, montre qu'un autre lipide, la céramide, est capable d'induire la courbure de la membrane de l'endosome tardif, et le détachement de vésicules. La céramide est issue du clivage d'une sphingomyéline en phosphatidylcholine et céramide, par l'action d'une sphingomyélinase (SMase). Les auteurs montrent que l'inhibition de la SMase diminue la sécrétion de la protéine PLP (*proteolipid protein*) associée à la surface des exosomes des oligodendrocytes. En revanche, la sécrétion de la protéine PLP associée à la surface des exosomes n'est pas perturbée par l'inhibition de l'expression des composants de la machinerie ESCRT (Trajkovic et al., 2008), ce qui suggère que ce mécanisme est indépendant de la voie ESCRT.

Actuellement, la communauté scientifique n'a pas encore déterminé si les multiples mécanismes de biogénèse présentés se déroulent simultanément dans un seul MVB, si plusieurs populations de MVBs peuvent co-exister dans une cellule, ou alors si le mécanisme est dépendant du type cellulaire (Kowal et al., 2014).

1.2.1.3. La fusion du MVB avec la membrane plasmique.

La libération des exosomes dans le milieu extracellulaire nécessite le transport du MVB et sa fusion à la membrane plasmique. La fusion du MVB à la membrane plasmique mobilise des protéines de la famille Rab, qui sont de petites GTPases qui contrôlent différentes étapes du trafic intracellulaire de vésicules (Stenmark, 2009). Elles sont impliquées dans l'amarrage du MVB à la membrane plasmique. Le premier membre de la famille à avoir été révélé est RAB11, il contrôle la libération des exosomes dans la lignée cellulaire K562 (Savina et al., 2005). Par la suite, deux études ont mis en exergue le rôle de différents membres de la famille RAB en déployant des techniques de criblage : la première a été mise en œuvre dans des oligodendrocytes (Hsu et al., 2010), alors que la seconde a utilisé une lignée de cellules cancéreuses (Ostrowski et al., 2010). Les résultats montrent que l'inhibition de Rab35 affecte la libération des exosomes dans une lignée d'oligodendrocytes (Hsu et al., 2010), tout comme dans des cultures primaires d'oligodendrocytes (Frühbeis et al., 2013). D'autre part, dans la lignée humaine RPE1, l'expression de soit Rab11 soit Rab35 est indispensable pour la libération des exosomes. Ce mécanisme a été décelé en étudiant la libération de la toxine ANTHRAX, qui est protégée

de la dégradation cellulaire grâce à son emballage dans les exosomes (Abrami et al., 2013).

Le second criblage a mis en évidence que la déplétion de Rab5a, Rab9a, Rab2b, Rab27a et Rab27b diminue la sécrétion des exosomes, l'impact de Rab27a et Rab27b étant plus fort (Ostrowski et al., 2010). D'ailleurs, l'implication de Rab27a dans la libération des exosomes a été confirmée dans divers modèles de cancers (Bobrie et al., 2012; Hoshino et al., 2013; Peinado et al., 2012), montrant son rôle crucial dans la libération des exosomes.

Par ailleurs, le rôle d'une autre famille de GTPase, la famille Ral, contribue également à la fusion du MVB avec la membrane plasmique, et la démonstration a été réalisée chez *C. elegans* et dans des lignées de cultures cancéreuses (Hyenne et al., 2015).

Après l'amarrage du MVB à la membrane plasmique, l'intervention d'autres acteurs est nécessaire pour permettre la réalisation de la fusion des deux membranes. L'intervention de la protéine VAMP-7, qui appartient à la famille SNARE, a été démontrée comme étant essentielle dans la libération des exosomes dans la lignée cellulaire K562 (Fader et al., 2009). En revanche, l'inhibition de VAMP-7 dans les cellules de la lignée MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) déstabilise la sécrétion des lysosomes, mais pas la libération des exosomes (Proux-Gillardeaux et al., 2007). Plus récemment, un travail démontre que la protéine YKT6, appartenant à la famille R-SNARE, est requise pour la libération des exosomes dans les cellules HEK 293 (Gross et al., 2012).

La biogénèse des exosomes semble être gouvernée par divers mécanismes, qui sont peut-être dépendants du type cellulaire (Figure 23).

1.2.2. La biogénèse des microvésicules.

Les mécanismes de la biogénèse des microvésicules, qui naissent par bourgeonnement de la membrane plasmique, sont encore moins élucidés et caractérisés que ceux des exosomes (Maas et al., 2017) (Figure 23).

L'un des mécanismes mis en œuvre consiste, tout comme pour les exosomes, au recrutement de la machinerie ESCRT, dans laquelle le complexe ESCRT-III induit une courbure de la membrane plasmique (Christ et al., 2017). La machinerie ESCRT peut être

recrutée par l'intermédiaire de la voie de signalisation déclenchée par le domaine arrestine (ARRDC1), qui est ancré à la membrane plasmique (Lefkowitz and Shenoy, 2005). En effet, les protéines arrestines s'associent avec des récepteurs couplés aux protéines G qui régulent leur signalisation (Lefkowitz and Shenoy, 2005). D'autre part, elles interagissent directement avec les protéines TSG101 et ALIX, ainsi qu'avec plusieurs ubiquitines ligases (Lin et al., 2008; Malik and Marchese, 2010; Nabhan et al., 2012; Rauch and Martin-Serrano, 2011), ce qui leur permet de recruter la machinerie ESCRT aisément. Au niveau de la synapse immunitaire, il a été montré que les récepteurs T sont sécrétés dans les microvésicules qui bourgeonnent à partir du centre de la synapse grâce à un processus qui nécessite TSG101 et VPS4 (Choudhuri et al., 2014). Ce mécanisme engendre un engagement transcellulaire de la part des cellules T du système immunitaire envers les cellules voisines qui présentent les antigènes.

La création ou l'altération de l'asymétrie de la membrane plasmique peut également provoquer la formation de vésicules (Clark, 2011). Cela peut inclure les altérations dues à des activités enzymatiques qui transfèrent les lipides d'une surface de la membrane plasmique à une autre, comme les flippases, les floppases ou les scramblases (Tuck, 2011). Pour donner un exemple concret, chez l'embryon de *Caenorhabditis elegans*, l'inhibition d'une flippase qui transfère la phosphatidylétholamine de la surface extérieure vers la surface intérieure de la membrane plasmique favorise le bourgeonnement de vésicules (Wehman et al., 2011).

D'autre part, des altérations dans la composition en céramide dues à l'activation de sphingomyélinases peut aussi induire une courbure de la membrane plasmique et entraîner la libération de microvésicules (Awojoodu et al., 2014; Hoehn et al., 2016), et ce mécanisme a notamment été démontré chez les astrocytes (Bianco et al., 2009).

1.3. La libération des vésicules extracellulaires dans le milieu extérieur : un mécanisme constitutif ou inducible ?

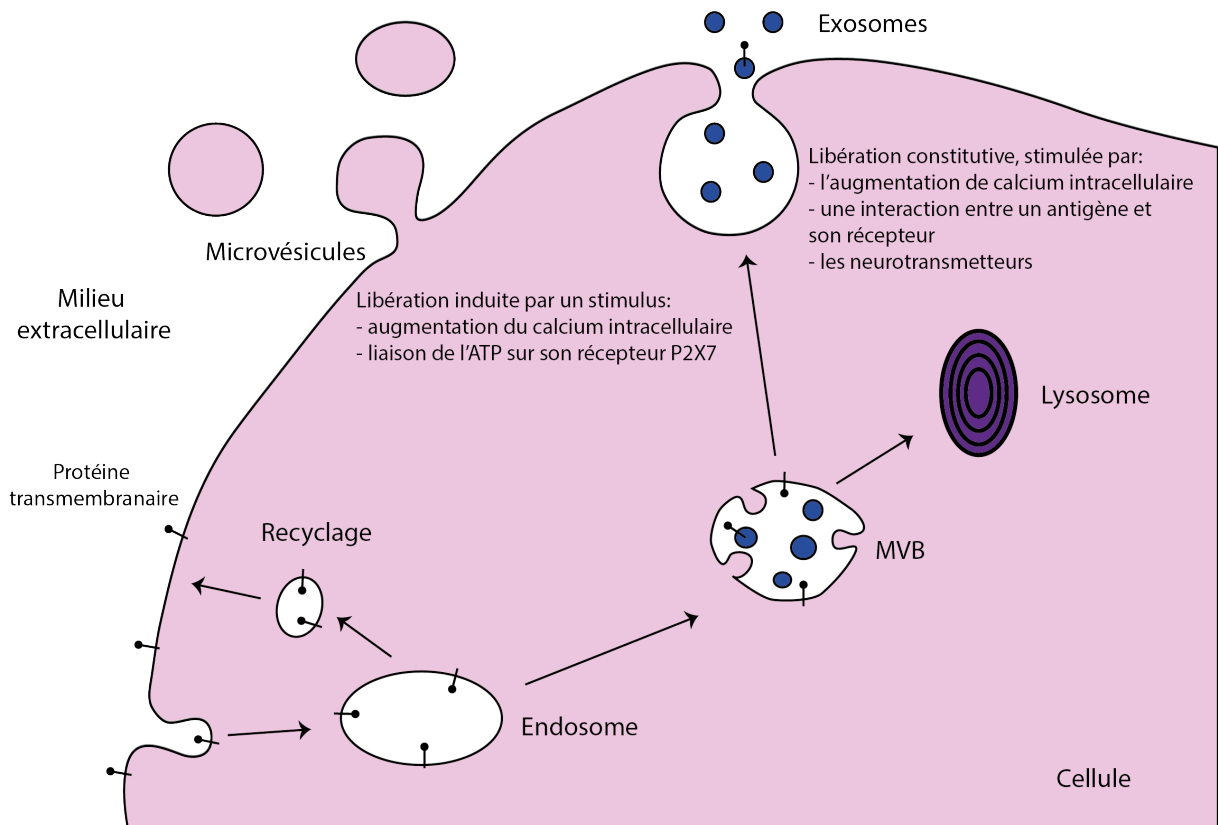


Figure 23: Représentation des *stimuli* favorisant la libération des exosomes et des microvésicules.

La libération des exosomes est un phénomène constitutif, qui peut être stimulé par divers signaux selon la nature de la cellule. La libération des microvésicules, en revanche, semble être dépendante d'un *stimulus* qui déclenche le bourgeonnement de la membrane.

Les EVs sont observées dans le milieu extracellulaire, tout comme dans les fluides corporels des organismes. Elles sont relativement stables, et protègent donc leur contenu des dégradations extérieures. Leur stabilité est en partie due à leur composition en lipides enrichie en cholestérol, sphingomyéline, annexine, phosphatidylserine et glycosphingolipides en comparaison avec la membrane plasmique.

La sécrétion des exosomes semble être un mécanisme constitutif, et l'analyse des exosomes se réalise généralement à l'état de repos des cellules, c'est à dire sans stimulation (Colombo et al., 2014).

En revanche, certains facteurs favorisent leur libération (Colombo et al., 2014), et c'est notamment le cas de la concentration intracellulaire en calcium. En effet, l'application de calcium augmente la libération des exosomes dans la lignée cellulaire K562 (Savina et al., 2003), dans les oligodendrocytes (Krämer-Albers et al., 2007), chez les cellules mastocytaires (Raposo et al., 1997) ainsi que dans les cellules dendritiques (Montecalvo et al., 2012). Par ailleurs, d'autres stimulations, spécifiques à un type cellulaire particulier ont été mises en lumière. C'est le cas de l'interaction de l'antigène CD4 du lymphocyte T avec les cellules dendritiques murines (Buschow et al., 2009). D'autre part, et cette information est intéressante pour ce travail de thèse, la sécrétion des exosomes par les cultures primaires de neurones de cortex est stimulée par la dépolarisation des cellules (Fauré et al., 2006) ou bien par les neurotransmetteurs, comme le glutamate (Lachenal et al., 2011). Ce dernier stimule aussi la libération des exosomes dans les oligodendrocytes (Frühbeis et al., 2013) (Figure 23).

Alors que la libération des exosomes semble constitutive et peut être régulée par un *stimulus*, celle des microvésicules est communément induite par un *stimulus*, qui provoque une augmentation de calcium intracellulaire et un remodelage du cytosquelette (Pasquet et al., 1996). Ainsi, l'ajout de calcium entraîne la libération des microvésicules, tout comme l'application d'autres *stimuli* comme le formyl-Met-Leu-Phe sur des neutrophiles (Hess et al., 1999), ou encore la liaison de l'ATP sur les récepteurs P2X7 des cellules myéloïdes (Figure 23).

1.4. La recapture des vésicules extracellulaires par les cellules receveuses.

Le concept des EVs qui agissent comme des messagers dans la communication intercellulaire implique que les EVs puissent interagir avec les cellules receveuses et induire des changements de leur physiologie. L'étude des mécanismes de recapture connaît une limitation importante, due à la difficulté de visualiser les vésicules (en particulier les exosomes) par microscopie optique, dont la résolution limite est de 200 nm. Cependant, quelques mécanismes ont tout de même pu être élucidés.

D'abord, la recapture des EVs semble dépendre de mécanismes qui nécessitent de l'énergie, car elle est supprimée à basse température (4°C) (Christianson et al., 2013; Escrevente et al., 2011; Morelli et al., 2004).

Comme présenté précédemment, les EVs se présentent sous la forme d'un compartiment délimité par une membrane lipidique, dans laquelle des récepteurs et des ligands sont insérés et positionnés vers l'extérieur, et qui enferment en leur lumen des protéines, et des ARNs (Maas et al., 2017). De ce fait, les EVs peuvent communiquer avec les cellules par différents moyens : **1)** par une interaction récepteur-ligand, **2)** par la fusion des deux membranes et la délivrance des molécules dans le cytoplasme de la cellule receveuse, **3)** ou encore par internalisation par endocytose (Figure 24).

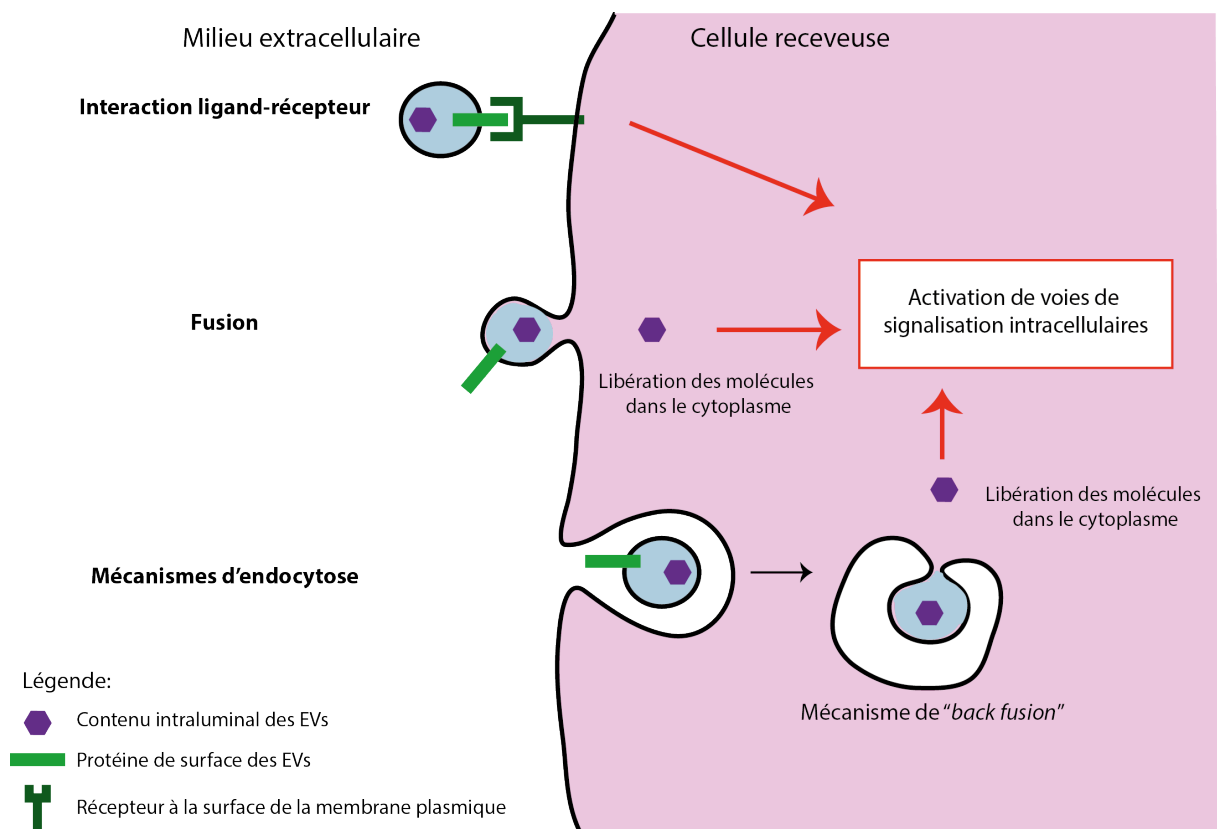


Figure 24: Mécanismes principaux de recapture des EVs par les cellules receveuses.

Il existe plusieurs mécanismes de recapture des EVs par les cellules receveuses : une interaction ligand-récepteur, la fusion de l'EV avec la membrane plasmique, ou encore l'endocytose des EVs. La recapture des EVs est suivie de l'activation de voies de signalisation intracellulaires, qui vont entraîner la modification de la physiologie de la cellule receveuse.

1.4.1. L'interaction ligand-récepteur entre les EVs et la membrane plasmique de la cellule receveuse.

Des interactions de type ligand-récepteur entre les EVs et les cellules receveuses ont été très largement observées et décrites, et ce particulièrement chez les cellules immunitaires. Par exemple, le rôle de LFA-1 localisé sur la membrane des cellules

immunitaires de type T permet de capturer les exosomes libérés par des cellules dendritiques, qui présentent à leur surface ICAM-1 (Segura et al., 2005). De plus, l'ajout d'anticorps dirigés contre LFA-1, et ICAM-1, provoque une inhibition partielle de la recapture des vésicules dendritiques, laissant penser que ces acteurs interviennent dans les mécanismes de recapture. Cette étude a aussi montré que les intégrines $\beta 3$ et les tétraspanines CD9 et CD81 sont aussi impliquées (Morelli et al., 2004).

D'autres interactions de ce type ont été rapportées. D'abord la liaison des EVs dérivées des cellules tumorales avec EGFRvIII a été observée (Al-Nedawi et al., 2008). Ensuite, les EVs issues d'une lignée cellulaire modélisant la sclérose tubéreuse se lient à NOTCH et RHEB (Patel et al., 2016). Enfin, les EVs de cellules souches neuronales activent la voie de signalisation IFN- γ /STAT1, possiblement par l'interaction entre IFNGR1 à la surface des EVs et IFNGR1 à la membrane plasmique (Cossetti et al., 2014).

Alors que dans certains cas la liaison des EVs à la surface suffit pour induire un changement de la physiologie de la cellule receveuse par l'induction de voies de signalisation intracellulaires, dans d'autres cas l'internalisation des molécules empaquetées dans les EVs est nécessaire, et cela nécessite la fusion de la membrane des EVs avec la membrane plasmique de la cellule receveuse.

1.4.2. La fusion des EVs avec la membrane plasmique.

La fusion des EVs avec la membrane plasmique des cellules receveuses a également été mise en évidence. Une sonde fluorescente lipidique, la rhodamine B octadécyle (R18), a été incorporée dans la membrane des EVs. Cette sonde a la caractéristique de n'émettre de la fluorescence que lorsqu'elle est présente en faible concentration. Deux études ont incorporé la sonde R18 à forte concentration dans la membrane des EVs, qui ne sont donc pas fluorescentes. Après l'incubation des exosomes marqués avec les cellules, de la fluorescence est révélée au niveau de la membrane plasmique des cellules, indiquant que les exosomes ont fusionné avec les cellules (Montecalvo et al., 2012; Parolini et al., 2009). La fluorescence est possible car la sonde est diluée dans la membrane plasmique.

Les mécanismes moléculaires sous-jacents qui sont mis en œuvre dans la fusion des membranes ne sont pas encore entièrement élucidés. Cependant, il semblerait que ce soient des mécanismes actifs, car la recapture est abrogée à 4°C et en présence d'EDTA extracellulaire, un chélateur du calcium (Montecalvo et al., 2012), et qu'ils mettent en

œuvre l'action de protéines de surface (Parolini et al., 2009). D'autre part, ce mécanisme de recapture semble plus probable pour les microvésicules que pour les exosomes. En effet, la composition lipidique et la taille de ces derniers semblent peu compatibles.

Après fusion des membranes, les molécules transportées dans le lumen des vésicules peuvent alors être déversées dans le cytoplasme de la cellule, et activer des voies de signalisation intracellulaires pour modifier la physiologie de la cellule (Figure 24).

1.4.3. L'internalisation des EVs par endocytose.

Enfin, la dernière possibilité de recapture des EVs est leur internalisation par endocytose, qui requiert un repliement de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule (Niedergang et al., 2017). Il existe plusieurs mécanismes d'endocytose, qui peuvent en partie se distinguer par la taille de la particule internalisée : les endocytoses à grande échelle et les endocytoses à petite échelle. Les endocytoses de grande échelle regroupent la phagocytose et la macropinocytose, alors que les endocytoses de petite échelle regroupent les mécanismes dépendants soit de la clathrine, soit de la cavéoline, et des mécanismes indépendants à la fois de la clathrine et de la cavéoline (Kumari et al., 2010). Ainsi, la taille de la vésicule qui se présente à la cellule receveuse peut influencer le mécanisme d'endocytose : les microvésicules, ou les agrégats d'exosomes sont susceptibles d'induire de la phagocytose ou de la macropinocytose, alors que les exosomes sont favorables à un mécanisme d'endocytose de petite échelle (Colombo et al., 2014) (Figure 25).

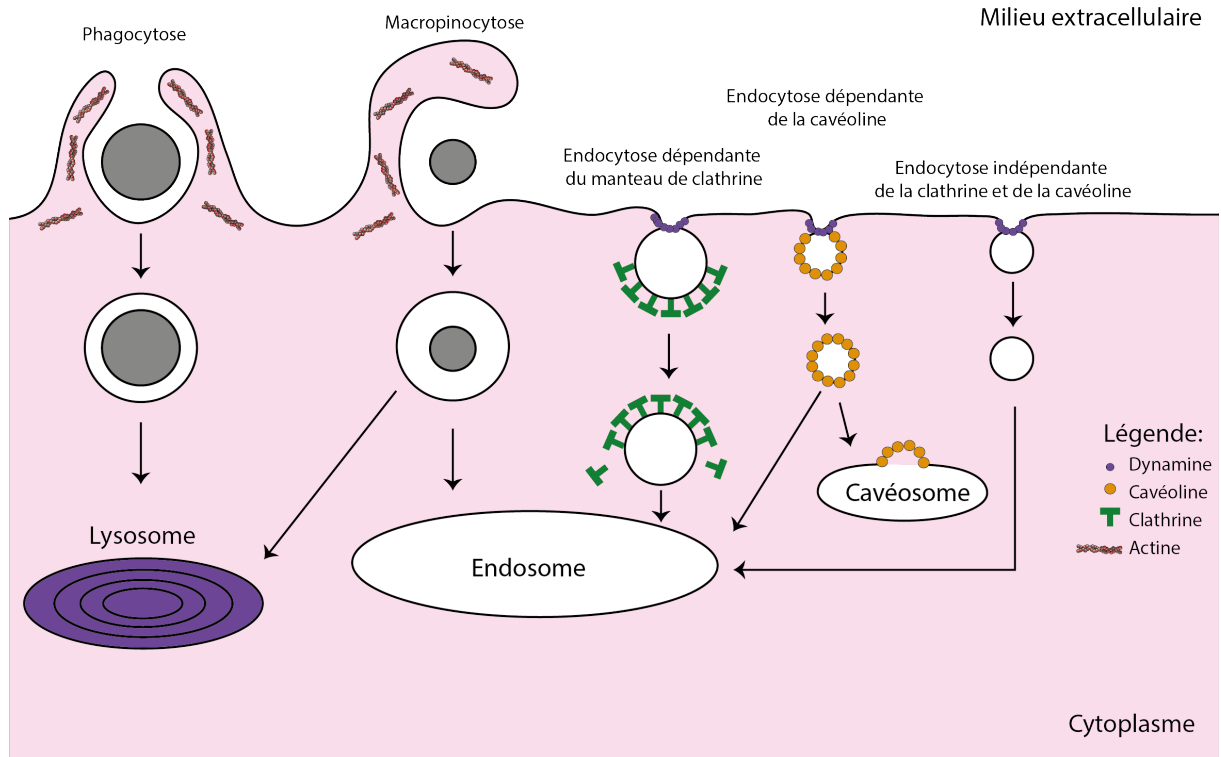


Figure 25: Représentation des différentes voies d'endocytose.

Il existe différentes voies d'endocytose, qui sont principalement déterminées par la taille de la particule. Si la particule est grande, un mécanisme de phagocytose sera privilégié (pour les cellules compétentes à la phagocytose). Si la particule est de taille moyenne, ou petite, les mécanismes de macropinocytose, ou d'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine et de la cavéoline seront mis en œuvre. Ce schéma est largement inspiré de : (Mayor and Pagano, 2007).

Les différentes voies d'endocytose ont été mises en évidence en combinant plusieurs méthodologies. Les EVs sont tracées à l'aide de sondes fluorescentes ou de billes d'or, combiné à une visualisation par microscopie optique et/ou électronique. Des inhibiteurs pharmacologiques sont utilisés pour révéler l'implication du cytosquelette, dont sa polymérisation est nécessaire pour les mécanismes d'endocytose à grande échelle. D'autres inhibiteurs pharmacologiques ont aussi été utilisés pour inhiber des composants connus pour intervenir dans une voie spécifique d'endocytose. Aussi, les auteurs ont utilisé des marqueurs spécifiques de compartiments cellulaires, pour identifier la localisation sub-cellulaire des EVs, par exemple dans l'endosome, le lysosome ou encore dans le phagosome (Figure 25).

Chez les macrophages, l'internalisation des EVs a été montrée comme étant dépendante de la dynamine, c'est à dire certainement par un mécanisme d'endocytose par le manteau de clathrine (Barrès et al., 2010), et par phagocytose (Feng et al., 2010).

Dans les cellules dendritiques, le mécanisme d'endocytose suite à l'interaction de l'exosome avec un récepteur de la membrane plasmique de la cellule receveuse a été rapporté (Morelli et al., 2004).

Un étude montre que les exosomes libérés par la lignée cellulaire PC12 peuvent être endocytés soit par macropinocytose, soit par le manteau de clathrine (Tian et al., 2014).

Dans le SNC, la micropinocytose intervient dans la recapture des EVs d'oligodendrocytes par les cellules microgliales (Fitzner et al., 2011), alors que pour les neurones, deux mécanismes sont décrits : la phagocytose d'une part, et l'internalisation par le manteau de clathrine d'autre part (Frühbeis et al., 2013). Par ailleurs, les exosomes issus de cellules de glioblastomes sont endocytés par un mécanisme dépendant des radeaux lipidiques associés à la cavéoline 1 (Svensson et al., 2013).

1.4.4. Le transport intracellulaire des EVs dans les cellules receveuses.

Après l'internalisation des EVs par endocytose, le trafic intracellulaire des EVs se réalise par transport le long des filaments du cytosquelette, et semble les diriger vers le lysosome, en d'autres terme vers la voie de dégradation (Tian et al., 2013). Cependant, pour que les EVs effectuent leur fonction de communication, il faut que leur contenu puisse être déversé dans le cytoplasme de la cellule. Les mécanismes d'endocytose, qui semblent être très fréquents, posent donc le problème de la réalisation effective de communication et d'échange de molécules.

Une étude peut partiellement répondre à la question précédente. Il est montré que les EVs, et en particulier les exosomes, sont capables de fusionner avec la membrane d'autres organelles. L'étude démontre que la toxine anthrax est empaquetée dans les vésicules intraluminales (ILVs) du MVB, dans lesquelles est elle protégée de la dégradation. Par ailleurs, les auteurs ont observé que les ILVs étaient capables de fusionner avec la membrane du MVB et de libérer leur contenu dans le cytoplasme de la cellule hôte, ou alors d'être libérées sous forme d'exosomes pour être propagées aux cellules avoisinantes (Abrami et al., 2013). Ainsi, ces résultats suggèrent que les EVs endocytées peuvent éventuellement fusionner avec la membrane des endosomes (phénomène de *back fusion*), et ainsi libérer leur contenu dans le cytoplasme de la cellule receveuse.

Les mécanismes de recapture des EVs sont divers, et il est possible qu'ils soient dépendants du type cellulaire, et de l'environnement. De plus, le mode d'entrée conditionne la nature du message physiologique : une interaction ligand-récepteur va activer des voies de signalisation intracellulaires, alors que la fusion à la membrane permet en plus la régulation locale de la cellule receveuse par les molécules déversées.

1.5. La composition des vésicules extracellulaires.

Le rôle communicatif suggéré pour les EVs repose sur les molécules qu'elles transportent à leur surface et dans leur lumière, et qu'elles transmettent aux cellules receveuses. Ainsi, les EVs sont délimitées par une membrane lipidique, et contiennent des protéines, et des ARNs (Figure 26).

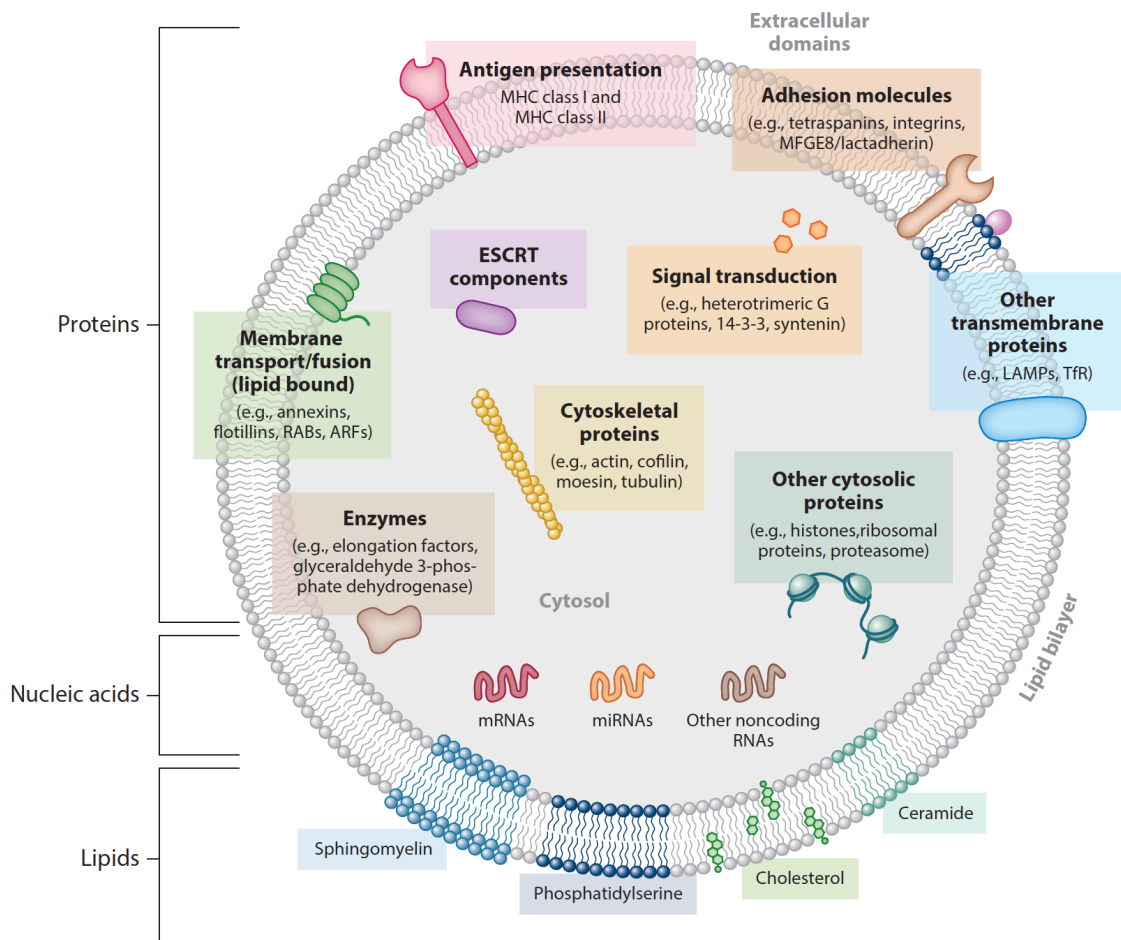


Figure 26: Représentation schématique de la composition des vésicules extracellulaires.

Ce schéma propose une vision synthétique de la composition des EVs, c'est à dire à la fois des exosomes et des microvésicules confondus. Ainsi, cela signifie que la composition individuelle diffère un peu selon que l'on s'intéresse aux exosomes ou aux microvésicules. Les abréviations sont les suivantes : ARF : *ADP ribosylation factor* ; ESCRT : *endosomal sorting complex required for transport* ;

LAMP : *lysosome-associated membrane protein* ; MHC : *major histocompatibility complex* ; MFGE8 : *milk fat globule-epidermal growth factor-factor VIII* ; RAB : *Ras-related proteins in brain* ; TfR : *transferrin receptor*. Source : (Colombo et al., 2014).

1.5.1. La composition des EVs en lipides.

Quelques études ont comparé la composition en lipides des exosomes par rapport aux membranes de la cellule (Laulagnier et al., 2004; Llorente et al., 2013; Trajkovic et al., 2008; Wubbolts et al., 2003), et observent un enrichissement de la membrane des exosomes en acides gras saturés, et particulièrement en sphingomyéline, phosphatidylsérine et cholestérol. De plus, sont retrouvés fortement exprimés le ganglioside GM3 (Llorente et al., 2013; Wubbolts et al., 2003), et les céramides ou leurs dérivés (Laulagnier et al., 2005; Llorente et al., 2013; Trajkovic et al., 2008). Cette composition lipidique rend les EVs protectrices, elles limitent donc la dégradation de leurs cargos.

1.5.2. La composition des EVs en protéines.

En comparaison avec l'étude lipidique, la composition des EVs en protéines a été largement étudiée. Les travaux révèlent que les exosomes contiennent des protéines issues de la membrane plasmique, du cytosol et de la voie endocytaire. En revanche, contrairement aux microvésicules, les exosomes ne contiennent pas de protéines qui proviennent de compartiments cellulaires et d'organelles, comme des protéines nucléaires, mitochondriales, de l'appareil de golgi ou du réticulum endoplasmique (Colombo et al., 2014; Kowal et al., 2016).

En 2009, Clotilde Théry a combiné les résultats de 15 études sur la composition en protéines des exosomes, et a établi une composition type, qui s'établit comme suit (Théry et al., 2009):

- Des protéines du **cytosquelette**, comme l'actine, la tubuline, et la cofiline 1 ;
- Des protéines impliquées dans le **trafic membranaire** : la famille Rab, les annexines ;
- Des protéines **chaperonnes** : HSP70 et HSP90 ;
- Des protéines associées aux **radeaux lipidiques**, et en particulier la flotilline1 ;
- Des protéines d'**adhésion**, comme les tétraspanines (CD63, CD9 et CD81) et les intégrines ;

- Des protéines impliquées dans la **formation du MVB** et associées à la **machinerie ESCRT**, et en particulier la clathrine, ALIX et TSG101 ;
- Le **complexe majeur d'histocompatibilité** de classe 1 et 2 ;
- Des protéines du **métabolisme**, et principalement GADPH ;
- Des protéines associées à la **synthèse protéique**, comme des facteurs d'élongation ;
- Des protéines de **signalisation intracellulaire** : la synténine, des protéines G, 14-3-3.

Plus récemment, une nouvelle étude extensive d'analyse comparative de la composition des EVs a été réalisée, également par l'équipe de Clotilde Théry (Kowal et al., 2016). Il est montré que, de manière générale, l'ensemble des protéines citées ci-dessus comme composant les exosomes, sont également retrouvées dans les microvésicules. En particulier, les tétraspanines CD63, CD9 et CD81, qui étaient jusqu'à présent usuellement utilisées comme marqueurs spécifiques des exosomes, sont aussi trouvées dans les microvésicules, et ne permettent donc pas de faire une réelle distinction entre les exosomes et les microvésicules (Crescitelli et al., 2013; Kowal et al., 2016). En revanche, le travail de Kowal et de ses collaborateurs révèle que 5 protéines sont spécifiquement enrichies dans les exosomes comparé aux microvésicules: le TSG101, la synténine 1, EHD4, ADAM10 et l'annexine XI, et cela est en concordance avec d'autres études pour les protéines TSG101 et synténine 1 (Baietti et al., 2012; Tosar et al., 2015). D'autre part, les protéines actinine 4 et mitofiline sont préférentiellement plus exprimées dans les vésicules larges de type microvésicules (Kowal et al., 2016).

Les protéines sont trouvées à la fois à la surface et à l'intérieur des EVs, suggérant une communication de nature combinatoire, et complexe (Maas et al., 2017). Cela concorde avec les démonstrations des différents mécanismes de recapture des EVs que nous avons évoqués: interaction ligand-récepteur, fusion, et endocytose, qui mettent en jeu des protéines de surface.

1.5.3. La composition des EVs en acides nucléiques.

La présence d'acides nucléiques dans les EVs a largement été mise en exergue par la communauté scientifique (Colombo et al., 2014). Plus particulièrement, alors que peu d'études rapportent la présence d'ADN, un grand nombre démontre la présence d'ARNm, et d'ARN non codants (Kim et al., 2017). En revanche, les ARNr 18S et 28S ne sont pas

déTECTABLES, ou alors présents en faible quantité (Colombo et al., 2014). Récemment, le profil en ARN a été finement étudié et comparé entre les exosomes et les microvésicules issues de 3 lignées cellulaires distinctes, et montre que les microvésicules contiennent très peu d'ARN, alors que les exosomes sont riches en petits ARNs (Crescitelli et al., 2013).

La présence de miARNs (mais aussi d'ARNm) dans les exosomes a en premier lieu été décrite dans l'étude réalisée par Valadi et ses collaborateurs (Valadi et al., 2007). Depuis sa publication, les études sur le rôle des miARNs vésiculaires se sont intensifiées, et démontrent leur capacité à réguler l'expression de leurs cibles dans les cellules receveuses (Ismail et al., 2013; Montecalvo et al., 2012; Pegtel et al., 2010; Valadi et al., 2007).

Les études récentes de RNA-Seq sur les EVs témoignent de la présence d'autres espèces de petits ARNs non codants : des ARNt, des vault ARNs, des Y-ARNs, et des piwiARNs (van Balkom et al., 2015; Huang et al., 2013; Lunavat et al., 2015; Nolte-'t Hoen et al., 2012).

1.5.4. Des bases de données dédiées à l'étude des EVs.

Les avancées sur la caractérisation biochimique des vésicules extracellulaires sont répertoriées dans des bases de données spécifiques :

- **ExoCarta** (Keerthikumar et al., 2016; Mathivanan and Simpson, 2009) est spécialisée dans le répertoire des molécules qui composent les exosomes (ARN, lipides et protéines), pour les espèces suivantes : l'Homme, le rat, la souris, la drosophile, le taureau, le cheval, la chèvre, le lapin et le cochon d'inde.
- **EVpedia** (Kim et al., 2013, 2015a) s'intéresse à l'ensemble des catégories de vésicules, chez les espèces allant des bactéries aux métazoaires.
- **Vesiclepedia** (Kalra et al., 2012) présente les mêmes fonctions que EVpedia. En revanche, Vesiclepedia regroupe la communauté de chercheurs qui travaille sur la thématique des vésicules extracellulaires, qui ont la responsabilité de la mise à jour de la base de données. La base de donnée ExoCarta a été intégrée à Vesiclepedia.

De manière générale, les études concernant la caractérisation biochimique de chacun des types d'EVs restent d'actualité, pour d'une part tenter d'identifier des marqueurs

spécifiques et d'autre part mieux appréhender les mécanismes de recapture et de communication. Cette thématique de recherche est d'autant plus indispensable que la composition biochimique des EVs semble largement dépendre de la nature et de l'état physiologique des cellules qui les libèrent (Colombo et al., 2014).

1.6. La sélection des cargos des EVs.

L'une des caractéristiques intéressantes des EVs est que le profil de leur contenu n'est pas réciproque à celui de la cellule, et qu'il évolue avec l'état physio-pathologique de la cellule (Abels and Breakefield, 2016).

Dans un premier temps, il semblerait que certains cargos protéiques soient spécifiquement chargés dans les exosomes selon que la voie de biogénèse implique les céramides ou la machinerie ESCRT (Kajimoto et al., 2013; Trajkovic et al., 2008).

Alors que la machinerie ESCRT privilégie la sélection des protéines ubiquitinylées qu'elle reconnaît, plusieurs études démontrent que la modification post-traductionnelle par l'ajout d'un oligo SUMO (*small ubiquitin like modifier*) permet l'empaquetage sélectif de cargos dans les EVs. Il est montré que l'intégration de la protéine α -synucléine dans les EVs est dépendante de sa SUMOylation. Plus particulièrement, la machinerie ESCRT est capable de reconnaître les protéines SUMOylées, et d'initier le recrutement de l'ensemble de ses complexes via l'interaction avec les phosphoinositols (Kunadt et al., 2015).

L'incorporation spécifique de certains ARNs dans les EVs peut s'expliquer par leur affinité différentielle avec les radeaux lipidiques à la surface de l'endosome ou de la membrane plasmique (Batagov and Kurochkin, 2013; Janas et al., 2006; Khvorova et al., 1999). Ces ARNs sont chargés dans les EVs au moment de leur formation.

Concernant les miARNs, le motif GGAG, reconnu par la ribonucléoprotéine hnRNPA2B1 SUMOylée, favorise l'empaquetage des miARNs dans les exosomes, chez les cellules immunitaires humaines (Villarroya-Beltri et al., 2013). Plus récemment, une étude met en évidence que le miR-223-3p, qui est spécifiquement enrichi dans les EVs CD63 positives comparé au contenu cellulaire, est empaqueté dans les EVs grâce à la protéine Y-box1, une protéine de la famille des *RNA-binding protein* (Shurtleff et al., 2016). Ces études

mettent en évidence la possible présence de motifs d'incorporation des miARNs dans les exosomes (EXOmotifs).

L'emballage spécifique des miARNs dans les exosomes semble aussi dépendre de modifications post-transcriptionnelles qui se localisent sur l'extrémité 3', car les miARNs adénylés en 3' sont plus souvent retrouvés dans la cellule, alors que ceux uridylés en 3' sont majoritairement retrouvés dans les exosomes (Koppers-Lalic et al., 2014). De plus, il est démontré que la sur-expression de l'enzyme nSMase2 augmente la quantité de miARNs libérés dans les vésicules extracellulaires. Cependant, cette enzyme est impliquée dans la biogénèse des exosomes, donc la possibilité selon laquelle l'augmentation du niveau de miARNs est due à l'augmentation de la production d'exosomes n'est pas à exclure (Kosaka et al., 2010).

Le rôle de la protéine AGO2 dans l'emballage des miARNs dans les EVs est controversé. En premier lieu, sa présence co-localise avec les MVBs (Gibbins et al., 2009; Lee et al., 2009), et une étude montre sa présence dans les microvésicules (Li et al., 2012a). Ensuite, l'extinction de l'expression de la protéine AGO2 est associée avec la diminution de miARNs dans les EVs, qui étaient en condition contrôle trouvés enrichis dans cette fraction (Abels and Breakefield, 2016). Ces résultats sont donc en faveur de l'hypothèse de l'implication de la protéine AGO2 dans l'emballage sélectif des miARNs dans les EVs. Cependant, d'autres études ne retrouvent pas la protéine AGO dans les EVs (Shurtleff et al., 2016), et démontrent que les miARNs qui sont co-purifiés avec la protéine AGO dans le milieu extracellulaire sont majoritairement hors des vésicules (Arroyo et al., 2011; Koppers-Lalic et al., 2014; Turchinovich et al., 2011). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la différence du type cellulaire d'étude.

Enfin, la sélection spécifique des ARNm dans les EVs semble également possible. Une première étude s'est attachée à comparer les séquences d'ARNs fortement enrichies dans les exosomes dans le but de trouver un éventuel caractère commun ou motif de reconnaissance. Les résultats mettent en évidence que les ARNs enrichis dans les exosomes ont une demi-vie plus courte que les ARNs intracellulaires, et qu'il existe une combinaison de motifs qui présentent une structure secondaire similaire, qui peut servir de reconnaissance à des *RNA-binding protein* (Batagov et al., 2011). De manière intéressante, beaucoup des motifs retrouvés dans l'étude, font également partie des séquences de liaison

des ARNs aux radeaux lipidiques, ce qui peut favoriser leur incorporation au moment de la formation des ILVs (Janas et al., 2006, 2015).

De plus, un motif, qui consiste en l'enchaînement de ces 5 bases : CUGCC, a été retrouvé dans la partie 3'UTR des ARNm, et a été défini comme favorisant l'empaquetage des séquences qui le comportent dans les microvésicules. Ce motif cœur se présente dans une structure en tige-boucle, et comporte un site de liaison pour le miR-1289. L'interaction du motif avec ce miRNA favoriserait l'empaquetage des ARNm qui possèdent ce motif (Bolukbasi et al., 2012).

Encore une fois, divers mécanismes de sélection spécifique des cargos dans les EVs ont été décelés, et leur réalisation semble dépendante de la nature de la cellule.

1.7. Les vésicules extracellulaires dans le SNC.

1.7.1. Le SNC : la co-existence de divers types cellulaires.

Le SNC se compose de plusieurs types de cellules qui agissent en étroite collaboration pour permettre la réalisation de ses fonctions. De manière sommaire, les différents types cellulaires peuvent se décomposer en deux grandes catégories : les neurones, et les cellules gliales, et cette dernière comporte principalement les astrocytes, les microglies et les oligodendrocytes. De nos jours, il est estimé que le rapport entre les neurones et les cellules gliales dans le cerveau est de un pour un en moyenne, avec des variations en fonction de la région cérébrale d'intérêt (Azevedo et al., 2009). Ceci témoigne de l'importance jouée par les cellules gliales dans la maintenance et la réalisation des fonctions cérébrales. Dans le but de mieux appréhender l'impact que propose la communication par les EVs dans le SNC, il me semble important de présenter brièvement tous ces acteurs.

1.7.1.1. Les neurones.

Les neurones représentent en moyenne 86 milliards de cellules dans le cerveau humain adulte (Azevedo et al., 2009). Ils sont composés d'un corps cellulaire, duquel l'axone et les dendrites prennent naissance. L'axone est le prolongement dans lequel se localisent les éléments pré-synaptiques du neurone, qui permettent au neurone d'intérêt de transmettre ses signaux aux autres neurones. Au contraire, les dendrites contiennent les épines dendritiques, c'est à dire les éléments-post-synaptiques des synapses chimiques. C'est donc le lieu de réception de la communication synaptique avec le réseau de neurones

avec lesquelles il est connecté. Les neurones sont à la base de la réalisation des fonctions cérébrales, grâce à la communication qu'ils établissent entre eux via les synapses chimiques et électriques (cf Chapitre 1, paragraphe 1.9.1.2).

1.7.1.2. Les oligodendrocytes.

Les oligodendrocytes sont des cellules importantes dans la fonctionnalité des neurones, car ils sont responsables de la formation de la gaine de myéline autour des axones, pour augmenter la vitesse de conduction de l'influx nerveux (Bradl and Lassmann, 2010).

1.7.1.3. Les astrocytes.

Les astrocytes sont nombreux dans le cerveau, et représenterait 30% du total des cellules (Herculano-Houzel et al., 2014). Ils interagissent avec les neurones et les vaisseaux sanguins pour approvisionner les neurones en métabolites (Pellerin et al., 2007). Aussi, ils éliminent et recyclent les neurotransmetteurs de la fente synaptique, et libèrent différents facteurs qui contrôlent la formation de la synapse et sa fonction (Fields et al., 2015; Zuchero and Barres, 2015). Ils sont donc cruciaux dans la fonctionnalité de la synapse et donc pour la communication neuronale. A ce propos, de nombreux travaux mettent en évidence qu'ils participent également activement à la transmission synaptique, donnant naissance au paradigme de la synapse tripartite (Araque et al., 1999a; Perea et al., 2009). La synapse tripartite sera évoquée plus en détails dans le chapitre 4.

1.7.1.3. Les microglies.

Les microglies sont les cellules immunitaires du SNC. Elles jouent le rôle de sentinelle, et passent de leur état inactivé de repos, à activé lorsqu'une perturbation se réalise dans le SNC (Wu et al., 2015), et combattent la perturbation pour maintenir le SNC dans un état physiologique. En condition physiologique, les microglies non activées sont très mobiles, et surveillent leur environnement. De plus, elles établissent des contacts transitoires avec les synapses (Nimmerjahn et al., 2005; Pfeiffer et al., 2016), et semblent capables de communiquer avec les neurones et les astrocytes, et de moduler la transmission synaptique (Hristovska and Pascual, 2015; Panatier and Robitaille, 2012). Ces nouvelles découvertes ont donné naissance au paradigme de synapse quadri-partite (Schafer et al., 2013), qui sera expliquée dans le chapitre 4.

1.7.2. Les EVs sont libérées par tous les types cellulaires du SNC.

Tous les types cellulaires du SNC sont capables de libérer des EVs en culture : les neurones (Fauré et al., 2006; Frühbeis et al., 2013; Lachenal et al., 2011; Morel et al., 2013), les astrocytes (Bianco et al., 2009; Frühbeis et al., 2013; Guescini et al., 2010; Taylor et al., 2007), les oligodendrocytes (Bakhti et al., 2011; Fitzner et al., 2011; Krämer-Albers et al., 2007), et les microglies (Bianco et al., 2005; Potolicchio et al., 2005).

D'autre part, des EVs, dont l'origine provient certainement d'un mélange de l'ensemble des cellules du SNC, sont détectées dans le liquide céphalorachidien humain et murin (Chiasserini et al., 2014; Marzesco et al., 2005; Perez-Gonzalez et al., 2012; Verderio et al., 2012). Ainsi, l'ensemble de ces données laisse penser que toutes les cellules du SNC libèrent des EVs *in vitro* et *in vivo*.

1.7.3. Le rôle des EVs dans le SNC en condition physiologique.

1.7.3.1. Le rôle des EVs dans la communication neuronale.

L'équipe de Rémy Sadoul est pionnière dans la démonstration de l'implication des exosomes dans la communication neuronale en condition physiologique. Elle a été la première à montrer que les cultures primaires de neurones de cortex libèrent des exosomes (Fauré et al., 2006). Cette même étude met en évidence, à l'aide d'un protocole de dépolarisation, que la libération des exosomes serait dépendante du niveau de l'activité neuronale. Aussi, les exosomes issus des neurones de cortex possèdent la molécule d'adhésion L1, et les sous-unités 2 et 3 des récepteurs AMPA. L'ensemble de ces résultats suggère que les exosomes peuvent jouer un rôle dans la régulation de la physiologie du neurone.

Par la suite, cette même équipe a affiné les résultats et montré que les exosomes sont préférentiellement libérés du corps cellulaire et des dendrites des neurones, comparé aux axones (Lachenal et al., 2011). D'autre part, l'équipe démontre que la libération des exosomes est modulée par l'activité synaptique glutamatergique (Chivet et al., 2014; Lachenal et al., 2011), et propose que les exosomes libérés sous l'influx glutamatergique sont recapturés spécifiquement par des neurones en comparaison aux cellules gliales (Chivet et al., 2014).

D'autres travaux également réalisés *in vitro* rapportent que la libération des EVs par des lignées cellulaires différenciées en neurones, est dépendante de la dépolarisation neuronale. Plus spécifiquement, la dépolarisation pendant 3h avec 25 mM de KCl de la lignée PC12 différenciée en cellules neuronales, augmente leur libération en exosomes (Bahrini et al., 2015). Aussi, un protocole de dépolarisation qui consiste à incuber plusieurs fois les cellules avec une solution de HBS à 100 mM KCl, augmente la libération des exosomes de la part de la lignée humaine de neuroblastes Sh-SY5Y (Goldie et al., 2014).

Une autre étude montre l'implication des exosomes dans le guidage axonal des neurones, par l'activation de la voie de signalisation ephrin-Eph (ephrin étant le ligand, Eph le récepteur) (Gong et al., 2016). Dans cette voie de signalisation, les ligands peuvent interagir avec les récepteurs (ephrin :Eph), ou alors les récepteurs peuvent aussi agir comme des ligands (Eph :ephrin), et ce phénomène est appelé signalisation réverse (Klein and Kania, 2014). Le récepteur à la tyrosine kinase Eph et ses ligands ephrin sont impliqués dans divers processus neuronaux comme le développement, le guidage des axones, ou encore la plasticité neuronale. Ces mécanismes se réalisent via une interaction qui implique un contact direct entre les cellules. L'étude de Gong et de ses collaborateurs montre pour la première fois que cette voie de signalisation peut agir à distance, via le transport du récepteur EphB2 dans les exosomes. Ce dernier agit avec ephrin B1 et provoque une répulsion des axones, contrôlant ainsi le guidage axonal (Gong et al., 2016).

1.7.3.2. Les EVs dans la jonction neuromusculaire de la drosophile.

Les études suivantes relatent de l'échange des EVs entre un motoneurone et la fibre musculaire, dans le cadre de la jonction neuromusculaire chez la drosophile.

Une première étude élucide le rôle des exosomes dans le transport de Wnt. En effet, Wnt est un ligand qui peut être libéré par les synapses, et qui active un grand nombre de voies de signalisation qui agissent pour réguler le développement de la synapse et la plasticité synaptique. Par ailleurs, les protéines Wnt sont très hydrophobes, ce qui signifie que leur diffusion dans le milieu extracellulaire est compliquée, et nécessite l'association à d'autres acteurs. Deux études de l'équipe de Budnik agissent de concert et mettent en exergue l'implication des exosomes libérés par les motoneurones dans le transport de Wnt, grâce à leur enrichissement en la protéine Evi qui agit comme un cargo de Wnt. Le mécanisme de la libération de Wnt via les exosomes est dépendant de l'action de la syntaxine-1a et de Rab11 (Koles et al., 2012; Korkut et al., 2009).

Un autre travail montre que les exosomes jouent un rôle important dans la régulation de la signalisation rétrograde des éléments post-synaptiques vers les éléments pré-synaptiques. Cette signalisation a pour objectif de maintenir les fonctions synaptiques, et intervient pendant le développement et dans la plasticité synaptique. Le travail de Korkut et de ses collaborateurs montre que le transport de la synaptotagmin-4, un signal rétrograde bien caractérisé dans la jonction neuromusculaire de la drosophile (Yoshihara et al., 2005), dépend de la libération des exosomes de la part des boutons pré-synaptiques. Plus particulièrement, l'activité du muscle localisé en post-synaptique, et induite par l'activation des récepteurs au glutamate, produit une robuste augmentation de l'activité de la part de l'élément pré-synaptique. La synaptotagmin-4 sert de senseur calcique en post-synaptique (c'est à dire dans le muscle), et son activation entraîne la libération de signaux rétrogrades, qui en retour stimulent la fonction pré-synaptique via l'activation du cAMP (Yoshihara et al., 2005). Ainsi, l'étude de Korkut et de ses collaborateurs montre que Syt4 est transporté aux muscles situés en position post-synaptique à travers les exosomes, qui sont libérés par le neurone pré-synaptique suite à une augmentation de l'activité (Korkut et al., 2013).

1.7.3.3. Le rôle des EVs dans la communication neurone-glie.

L'équipe de Claudia Verderio s'intéresse à la communication intercellulaire via les EVs entre les microglies et les autres types cellulaires du SNC. Un premier travail suggère l'implication des microvésicules libérées par les microglies dans la régulation de la transmission synaptique en influençant la probabilité de libération des neurotransmetteurs. Les microvésicules libérées par les microglies modulent positivement la libération des neurotransmetteurs de manière dose-dépendante, en activant la voie de biogénèse de la sphingosine dans les neurones pré-synaptiques (Antonucci et al., 2012). En effet, le lipide sphingosine et son métabolite sphingosine-1P facilitent la libération des neurotransmetteurs de la part des terminaisons synaptiques (Darios et al., 2009; Kanno et al., 2010; Norman et al., 2010; Okada et al., 2009).

Une seconde étude propose que les EVs issues des microglies sont capables d'inhiber la libération des neurotransmetteurs de la part des neurones GABAergiques, en activant le récepteur cannabinoïde de type 1 grâce au ligand N-arachidonoyléthamique qu'elles transportent (Gabrielli et al., 2015).

Par ailleurs, il est démontré que la libération des exosomes de la part des microglies peut être sous le contrôle de l'activité neuronale, et en particulier sous le contrôle de la libération du neurotransmetteur sérotonine. En effet, cette étude dévoile la présence de récepteurs à la sérotonine à la surface des cellules microgliales : les récepteurs 5-HT_a, b et 5-HT₄. D'autre part, l'activation de ces récepteurs module la libération des exosomes de la part des microglies, et cette dernière est dépendante de la voie de signalisation calcique (Glebov et al., 2015).

Un autre travail propose que les exosomes interviennent dans l'élimination des synapses inactives par les microglies, un phénomène commun qui se déroule au cours du développement et en cas de pathologie. L'étude a été réalisée à partir de cultures d'une lignée différenciée en neurones (PC12), et d'une lignée de microglies de souris (MG6). Il est proposé que les synapses actives des neurones libèrent des exosomes, qui, lorsqu'ils sont mis en contact avec la culture de microglies, entraînent une augmentation de l'expression de la protéine C3 chez ses dernières. La protéine C3 est connue pour activer des voies de signalisation qui augmentent les mécanismes d'élimination de synapses inactives de la part des microglies. Ainsi, ce travail suggère que le transfert d'exosomes entre les neurones et les microglies intervient dans la régulation des mécanismes d'élimination des synapses (Bahrini et al., 2015).

Les astrocytes contrôlent également la libération des EVs de la part des microglies. Plus particulièrement, les astrocytes sont capables d'activer la libération de la cytokine IL1- β à travers la sécrétion d'EVs de la part des microglies. Pour cela, les astrocytes libèrent de l'ATP, qui active le récepteur P2X7 situé à la surface des microglies (Bianco et al., 2005).

La communication bidirectionnelle entre les neurones et les oligodendrocytes par l'échange d'EVs a également été démontrée. En particulier, il est montré que la libération neuronale de glutamate favorise la sécrétion d'exosomes de la part des oligodendrocytes grâce à l'activation des récepteurs au glutamate localisés à la surface des oligodendrocytes. En retour, les exosomes libérés par les oligodendrocytes sont recapturés par les neurones, et régulent le transcriptome et l'activité du réseau neuronal (Fröhlich et al., 2014; Frühbeis et al., 2013).

Les oligodendrocytes sont également capables de transférer des EVs spécifiquement aux microglies, dans le but de faire dégrader les auto-anticorps contre la gaine de myéline

qu'ils produisent. Ainsi, les exosomes produits par les oligodendrocytes sont spécifiquement internalisés par les microglies, par un mécanisme de macropinocytose. La recapture des exosomes n'entraîne pas de réponse inflammatoire de la part des microglies, et se réalise préférentiellement par une sous-catégorie de microglies qui expriment peu MHC II (*Major histocompatibility complex II*). Ces résultats suggèrent que les microglies vont dégrader le contenu des exosomes (Fitzner et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats est synthétisé dans la Figure 27.

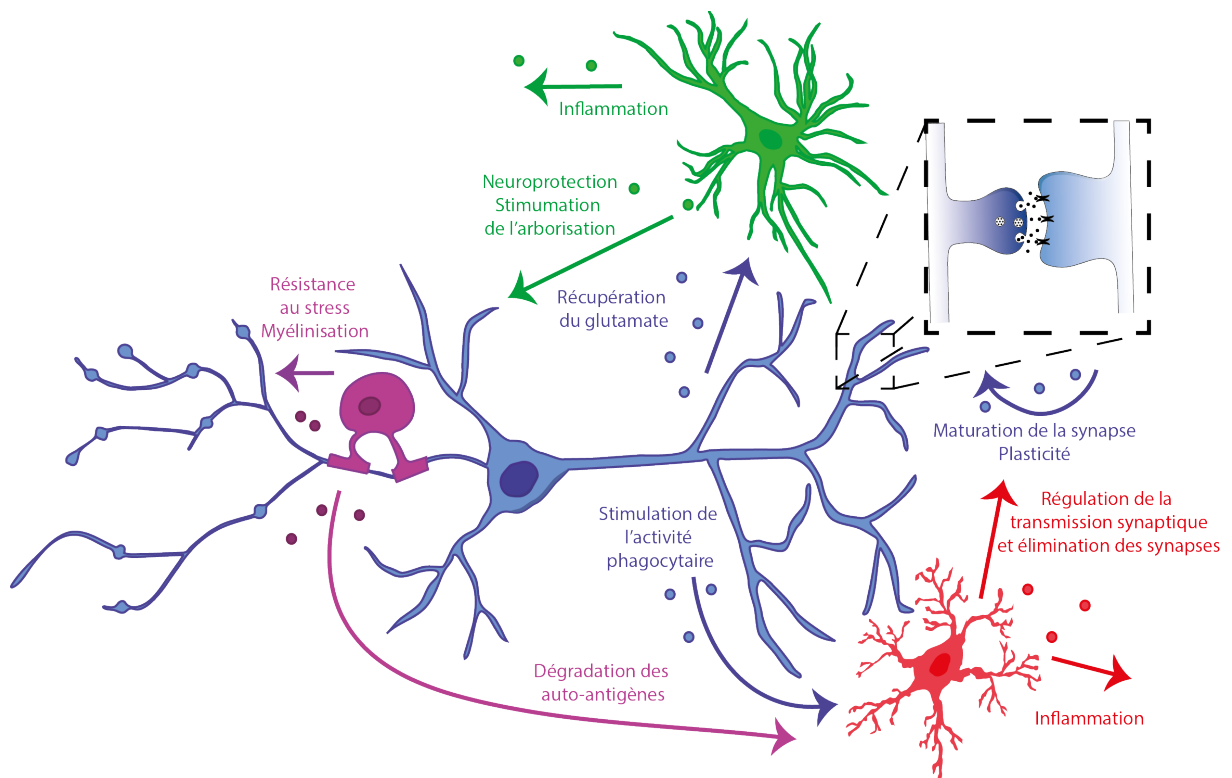


Figure 27: Représentation des rôles principaux des EVs dans le SNC.

Les neurones sont représentés en bleu, les oligodendrocytes en mauve, les microglies en rouge et les astrocytes en vert. Ce schéma synthétise les principaux rôles attribués aux EVs dans le SNC. Source : (Krämer-Albers and Hill, 2016; Zappulli et al., 2016).

1.7.3.4. Les EVs dans la communication avec la périphérie.

De manière très intéressante, plusieurs travaux évoquent la capacité des EVs à traverser les barrières entre les tissus, et en particulier la barrière hémato-encéphalique (Chen et al., 2016; García-Romero et al., 2017; Skog et al., 2008). En revanche, les mécanismes n'ont pas encore été mis en lumière (Krämer-Albers and Hill, 2016; Rufino-

Ramos et al., 2017). La barrière hémato-encéphalique procure au cerveau une protection physiologique contre l'exposition aux toxines et aux pathogènes. Elle est particulière, car elle est capable de modifier sa perméabilité. La perméabilité de cette dernière peut être atteinte et modifiée lors de pathologies (Patel and Patel, 2017). La capacité des EVs à traverser la barrière hémato-encéphalique ouvre des perspectives intéressantes pour la thérapie du SNC. En effet, d'une part les EVs peuvent renfermer des biomarqueurs, accessibles aisément pour les cliniciens, et intéressant pour la détection de pathologies. D'autre part, les EVs peuvent être chargées en molécules thérapeutiques, et servir de vecteurs thérapeutiques (Patel and Patel, 2017; Rufino-Ramos et al., 2017; Zappulli et al., 2016).

1.8. Le rôle des EVs dans les maladies neurodégénératives et les tumeurs cérébrales.

Plusieurs maladies neurodégénératives sont associées à la propagation de protéines mal repliées ou d'isoformes infectieuses, comme la maladie à prions, Alzheimer avec les plaques β -amyloïdes et Parkinson avec les fibrilles α -synucléine. Les mécanismes de la propagation de ces agents pathologiques d'une cellule à l'autre via les EVs sont largement étudiés. La pathologie ne faisant pas l'objet de ce travail de cette thèse, je renvoie aux revues suivantes : (Howitt and Hill, 2016; Lim and Lee, 2017; Liu et al., 2017).

Par ailleurs, les EVs sont également mises en cause dans la progression et la propagation des cellules tumorales cérébrales (D'Asti et al., 2016; Mondal et al., 2017; van der Vos et al., 2011). Dans le cas du glioblastome, une étude montre que le contenu des EVs en protéines et ARN, et particulièrement en miARNs, permet la croissance et la propagation des cellules tumorales (Skog et al., 2008).

1.9. La communication dans le SNC par le transfert de miARNs contenus dans les vésicules extracellulaires.

Récemment, le séquençage de miARNs exosomaux réalisé à partir d'échantillons de liquide céphalorachidien (LCR) de patients sains a été réalisé. L'analyse révèle que les miARNs qui sont trouvés dans le LCR des patients sont très majoritairement associés à la fraction exosomale, et peu retrouvés libres. Par ailleurs, beaucoup de miARNs exprimés dans le LCR, sont des miARNs connus pour être enrichis dans le SNC, ce qui signifie que la signature de miARNs exosomaux dans le LCR peut refléter celle du SNC, et témoigner

de son état physio-pathologique (Yagi et al., 2017). Ce travail valide l'hypothèse selon laquelle les exosomes libérés par les cellules du SNC contiennent des miARNs, cependant leur transfert et leur pouvoir régulateurs restent à démontrer.

La première étude qui a mis en évidence le transfert de miARNs entre les cellules via les exosomes, et leur pouvoir régulateur dans les cellules receveuses, a été réalisée par Valadi et ses collaborateurs il y a maintenant 10 ans (Valadi et al., 2007). Cette étude a été réalisée dans des cellules immunitaires. Elle a ouvert une nouvelle ère de recherche visant à décrypter les mécanismes d'emballage des miARNs dans les EVs, et surtout leurs rôles dans la régulation cellulaire, dans divers modèles cellulaires, et ceci en condition physiologique et pathologique.

Dans le SNC, un travail démontre que le contenu de neuroblastes en miARNs est modulé en fonction de l'activité neuronale. En particulier, la dépolarisation de la lignée de neuroblastes humaine est associée à une diminution de l'expression des miARNs dans les prolongements, mais pas dans les corps cellulaires. De manière très intéressante, une partie des miARNs est retrouvée libérée dans le milieu extracellulaire, protégée et emballée dans des exosomes. La moitié des miARNs qui sont identifiés dans les exosomes après la dépolarisation était initialement enrichie dans les neurites en comparaison avec le corps cellulaire. Par ailleurs, les exosomes sont également enrichis en protéine MAP1b (*microtubule-associated protein1b*). Cette dernière est largement impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique et contrôle le remodelage du cytosquelette. Cette étude très intéressante propose que les exosomes libérés par les neuroblastes après des traitements dépolarisants peuvent participer à la régulation de la plasticité neuronale, en partie grâce à leur contenu en miARNs (Goldie et al., 2014).

D'autre part, les miARNs transportés dans les exosomes neuronaux peuvent également moduler le transcriptome des cellules gliales, et en particulier des astrocytes. Les astrocytes pérисynaptiques expriment des transporteurs au glutamate qui permettent de contrôler le niveau de glutamate dans la fente synaptique et donc *in fine* de réguler l'activité synaptique. Une étude, réalisée à partir de cultures primaires de neurones et d'astrocytes de souris, montre que l'ajout d'exosomes dans le milieu de culture des astrocytes, qui sont libérés par les neurones et qui contiennent miR-124a, entraîne une régulation indirecte positive de l'expression du transporteur au glutamate GLT1 chez les astrocytes (Morel et al., 2013). Ce mécanisme pourrait constituer un point de contrôle additionnel pour l'élimination de l'excès de glutamate de la fente synaptique par les astrocytes.

Les astrocytes sont également capables de libérer des EVs. Une étude récente publiée dans le célèbre journal *Nature* démontre le rôle de PTEN, un important gène suppresseur de tumeurs, dans la protection contre le mécanisme métastatique des cancers cérébraux. Les auteurs ont injecté des cellules tumorales issues de l'Homme et de la souris, qui expriment PTEN dans plusieurs régions de l'organisme. Ces dernières perdent l'expression de PTEN uniquement lorsqu'elles sont injectées dans le cerveau, et pas dans les autres organes. La perte de l'expression de PTEN favorise le pouvoir métastatique des tumeurs cérébrales. La régulation induite par l'environnement propre au SNC dépend de la libération par les astrocytes d'exosomes qui contiennent des miARNs qui ciblent PTEN (Zhang et al., 2015a). Cette étude renforce l'importance de l'échange des miARNs exosomaux issus des astrocytes.

Dans le but de mieux appréhender le pouvoir régulateur des miARNs exosomaux des astrocytes en condition physiologique, Joviciv et ses collaborateurs ont caractérisé leur miRNome. Cette étude s'est réalisée à partir de cultures primaires d'astrocytes de souris en comparaison avec leur miRNome intracellulaire (Jovičić and Gitler, 2017). Ils démontrent que le profil en miARNs dans les exosomes est distinct de celui des astrocytes, et qu'un groupe de miARNs est largement enrichi dans les exosomes. Cette étude soutient l'hypothèse selon laquelle les miARNs exosomaux exercent un pouvoir régulateur d'importance dans le SNC.

La protéine synapsine I est exprimée dans le système nerveux des vertébrés et des invertébrés (Candiani et al., 2010; Kao et al., 1999), elle est spécifique des neurones, elle est associée aux vésicules synaptiques et joue un rôle dans le développement neuronal (Fornasiero et al., 2010) et la transmission synaptique (Cesca et al., 2010). Cependant, sa présence est étonnamment décelée dans les cultures d'astrocytes (Maienschein et al., 1999). Par ailleurs, une étude démontre que les cultures d'astrocytes sont capables de libérer la protéine synapsine I via les exosomes, dans des conditions particulières telles qu'une activité neuronale intense, ou un stress oxydatif. La protéine synapsine I ainsi transportée par les exosomes peut moduler la croissance des neurones et leur interaction avec les cellules gliales (Wang et al., 2011).

Pusic et ses collaborateurs mettent en lumière le rôle neuroprotecteur des miARNs exosomaux. Plus précisément, les exosomes issus du plasma de rats naïfs, ou élevés dans

un milieu enrichi (qui consiste à augmenter l'activité physique, intellectuelle et sociale des rats) ont été isolés. Ensuite ils ont soit été ajoutés sur des tranches d'hippocampe, ou injectés par voie intranasale dans des rats naïfs. Les exosomes issus des rats élevés en condition enrichie augmente significativement la myélinisation des neurones, et diminue le stress oxydatif, améliorant ainsi le microenvironnement neuronal. De manière très intéressante, le miR-129 est trouvé sur-représenté dans les exosomes qui proviennent des rats des milieux enrichis, et ce miARN est nécessaire et suffisant pour induire la différenciation des précurseurs des oligodendrocytes en oligodendrocytes matures capables de créer la gaine de myéline (Pusic et al., 2016).

Ainsi, l'ensemble de ces démonstrations suggère que l'échange de miARNs via les EVs entre les différents types cellulaires participe à la physiologie du SNC. Cependant, ce mode de communication reste peu étudié dans le SNC.

1.10. La problématique de l'étude : le transfert de miARNs dans les EVs participe-t'il à la régulation de la plasticité neuronale ?

Les vésicules extracellulaires sont considérées comme étant une nouvelle voie de communication inter-cellulaire. Ce mode de communication semble être utilisé par tous les types cellulaires des métazoaires.

Plusieurs études suggèrent que dans le SNC, l'échange des EVs entre les neurones et les cellules gliales intervient dans la modulation de divers processus, importants pour sa physiologie : la transmission synaptique, la myélinisation, l'inflammation, la protection des neurones, ou encore l'arborisation dendritique. En revanche, le rôle des miARNs contenus dans les EVs est peu caractérisé dans le SNC, en condition physiologique. **Nous nous sommes demandés si les miARNs transportés par les EVs peuvent participer à la régulation de la plasticité neuronale.**

2. Manuscrit 3 : Extracellular vesicles released by hippocampal cultures contain a miRNA repertoire regulated by neuronal activity which induces transcriptomic regulations in recipient cells.

L'objet de cette étude est d'étudier la pertinence de l'échange des miARNs vésiculaires dans les mécanismes de la régulation de la plasticité neuronale. Pour cela, nous avons mis en œuvre des techniques de biologie cellulaire, moléculaire, et de séquençage haut-débit.

Notre étude confirme que les cellules du SNC libèrent des EVs, et montre que les EVs contiennent des miARNs. Nous démontrons pour la première fois que le contenu en miARNs des EVs varie en fonction de l'activité neuronale. De plus, nous montrons que l'incorporation des miARNs dans les EVs semble être un mécanisme actif et sélectif. Dans un second temps, nous montrons que l'ajout d'EVs issues de cultures dont l'activité neuronale a été augmentée, entraîne une régulation chez les cellules receveuses de l'expression de gènes intervenant dans la plasticité neuronale.

Ainsi, nos résultats suggèrent que l'échange de miARNs vésiculaires est un nouveau moyen de communication entre les cellules du SNC. De plus, notre étude soulève l'hypothèse de la pertinence de ce mode de communication dans la régulation de la plasticité neuronale.

Dans ce travail, j'ai participé à l'élaboration des stratégies expérimentales mises en œuvre, et j'ai réalisé l'essentiel du travail expérimental (en dehors de l'électrophysiologie, de la microscopie électronique et de la spectrométrie de masse). J'ai également analysé les résultats, réalisé les figures, et participé activement à l'écriture du manuscrit.

Extracellular vesicles released by hippocampal cultures contain a miRNA repertoire regulated by neuronal activity which induces transcriptomic regulations in recipient cells.

Anaïs Soula^{1,2}, Melina Petrel³, Jean-William Dupuy⁴, André Calas^{1,2}, Alain Trembleau⁵, Marc Landry^{1,2}, Alexandre Favereaux^{1,2}

1: University of Bordeaux, Bordeaux, France.

2: CNRS, UMR 5297, Interdisciplinary Institute of Neuroscience, Bordeaux, France.

3: Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS, US4 INSERM, University of Bordeaux, Bordeaux, France.

4: Centre de Génomique Fonctionnelle, Plateforme Protéome, Bordeaux, France.

5: Neuroscience Paris Seine - Institute of Biology Paris Seine, CNRS UMR8246, INSERM U1130, Sorbonne Universités, Paris, France.

Keywords: extracellular vesicles/ central nervous system/ microRNAs

Abstract

Inter-cellular communication is an essential process in living organisms and extracellular vesicles (EVs), such as microvesicles and exosomes, were recently proposed as a new way of cell to cell communication in the nervous system. The signalization operated by EVs is in part mediated through their protein and RNA content. In this study, we focused on the microRNA (miRNA) cargo of EVs released by hippocampal cells. We showed that the miRNA repertoire of EVs depends on the neuronal activity level. In particular, several miRNAs are specifically enriched in EVs in response to neuronal activity increase. Furthermore, we studied the impact of these activity-dependent miRNAs on the gene expression in the recipient cells. Indeed, incubation of hippocampal cells with EVs coming from activated cultures induced a regulation of the transcriptome of recipient cells. Among the genes regulated by EV-miRNAs, many were involved in the mechanisms of neuronal plasticity strongly suggesting the key role of EVs in nervous system functions.

Introduction

Inter-cellular communication is an essential process in living organisms, and can occur by different means, such as soluble mediators or direct membrane contacts. Recent evidences suggest that extracellular vesicles, mainly composed by microvesicles and exosomes, are a new way of cell to cell communication (Tkach & Théry, 2016; Lopez-Verrilli & Court, 2013).

Microvesicles and exosomes can be distinguished by their size and their biogenesis (Colombo *et al*, 2014). Microvesicles (50-2000 nm) arise through direct outward budding and fission of the plasma membrane (Hugel *et al*, 2005; Muralidharan-Chari *et al*, 2009). Exosomes (30-150 nm) come from the endocytic pathway, in which early endosomes are matured in late endosomes (Stoorvogel *et al*, 1991), and during this process, they accumulate intraluminal vesicles by inward budding of the endosomal membrane, creating the multi-vesicular body (MVB). The MVB can fuse with the plasma membrane, and release outside the cell intraluminal vesicles that are then called exosomes (Pan & Johnstone, 1983; Harding *et al*, 1983).

Extracellular vesicles (EVs) play a key role in inter-cellular communication, as it has been demonstrated in dendritic cells. Indeed, binding and recapture of exosomes secreted by activated dendritic cells turned naive dendritic cells into immuno-competent cells (Morelli *et al*, 2004; Théry *et al*, 2002). The signalization operated by EVs is mediated via their content, which is composed of proteins, lipids and RNAs like mRNA or microRNAs (miRNAs) (Chaput & Théry, 2011). For example, exosomes released by mast cells were reported to contain RNAs including miRNAs and mRNAs, which modulate the protein expression of recipient cells (Skog *et al*, 2008; Valadi *et al*, 2007). In addition, this content varies depending

on the cell origin and the physiological or pathological conditions (Abels & Breakefield, 2016; Colombo *et al*, 2014).

The nervous system is the organ responsible for important physiological functions such as the locomotion, the vision, the memory and the learning. The function of the nervous system is critically dependent on proper inter-neuronal communication. Signal transduction mediated by neurotransmitters release at synapses is the main form of neuronal communication (Regehr *et al*, 2009). However, neuronal cells are not the only critical cells for brain functions, glial cells, such as microglia, astrocytes and oligodendrocytes are also key players. Indeed, many evidences proved the critical importance of the interplay between neurons and glia in the formation and the remodeling of synapses and circuits (Stogsdill & Eroglu, 2017).

EVs have been proposed as a novel way for inter-cellular communication in the nervous system, involved both in physiological conditions and in the transmission of pathogenic proteins (Zhang & Yang, 2017; Krämer-Albers & Hill, 2016; Budnik *et al*, 2016). Several reports have already described the release of EVs by the different cell-types composing the central nervous system: neurons (Korkut *et al*, 2009; Fauré *et al*, 2006), astrocytes (Taylor *et al*, 2007; Gosselin *et al*, 2013), microglial cells (Potolicchio *et al*, 2005; van der Vos *et al*, 2016) and oligodendrocytes (Krämer-Albers *et al*, 2007; Bakhti *et al*, 2011).

More particularly, some reports suggest that EVs could be involved in the regulation of neuronal plasticity (Fauré *et al*, 2006; Lachenal *et al*, 2011), a phenomenon characterized by an adaptation of the size and the strength of synapses upon activity changes, through post-

translational modifications and changes in gene expression (Cotman & Nieto-Sampedro, 1984; Caroni *et al*, 2012). Indeed, it has been demonstrated that EVs released upon neuronal activation from both neuronal and glial cells, seem to selectively bind to neurons (Chivet *et al*, 2014). This result suggests that EVs in the brain are in part responsible for the regulation of neuronal plasticity.

The involvement of miRNAs, which are small endogenous non-coding RNAs operating a negative translational regulation of mRNAs (Bartel, 2004) has been largely demonstrated in neuronal plasticity mechanisms (Aksoy-Aksel *et al*, 2014). For instance, the overexpression of miR-134 in rat hippocampal neurons reduced the size of dendritic spines, which form the post-synaptic compartments of most excitatory synapses (Schratt *et al*, 2006). Another work confirmed the role for miR-134 in the regulation of synaptic plasticity *in vivo*. Indeed, virus-mediated overexpression of miR-134 on the CA1 region of the hippocampus in mice abrogates long-term potentiation, a form of synaptic plasticity increasing the strength of a synapse in response to synaptic activity (Gao *et al*, 2010).

miRNAs play also a pivotal role in homeostatic plasticity, a form of neuronal plasticity where the strength of synapses adjust to compensate changes in network activity. For example, we previously showed that miR-92a regulates GluA1 translation during activity blockade in hippocampal neurons, and is necessary for the synaptic scaling associated with the incorporation of new GluA1 receptors at the membrane (Letellier *et al*, 2014). More recently, during homeostatic downscaling by picrotoxin treatment, it has been shown that miR-129-5p, which regulates Rbfox1 gene, coordinates the repression of synaptic genes (Rajman *et al*, 2017). The aim of this work is to study the transfer of miRNAs contained in EVs during neuronal

activity modulation, in order to evaluate their role in the mechanisms of neuronal plasticity. To explore this question, we first confirmed the presence of MVBs in hippocampal primary cultures by electron microscopy, and then the release of EVs by these cells. Then, we demonstrated that EVs from hippocampal primary cultures contain miRNAs, and that the miRNA signature of EVs depends on the neuronal activity level. Furthermore, we studied the impact of these activity-dependent miRNAs on the gene expression of recipient cells. Indeed, we incubated cells with EVs coming from either non-activated or activated cultures. Then, we analyzed the transcriptomic profile of the recipient cells by RNA-Seq and showed that gene expression is correlated with the miRNAs enriched in EVs. This study demonstrates, for the first time, that the content of miRNAs in EVs is modulated by neuronal activity, and that the miRNAs transported by EVs could regulate, in recipient cells, genes involved in the mechanisms of neuronal plasticity.

Results

Multi-vesicular bodies are present in the hippocampus

In order to better understand the role of EVs communication in the regulation of neuronal plasticity, we worked on rat primary hippocampus cultures, an interesting model to analyze plasticity properties *in vitro* and in which we can easily manipulate neuronal activity (Constals *et al*, 2015). First, we wanted to confirm that MVBs which are the organelles responsible for exosomes formation and release in the extracellular space by fusion with plasma membrane, are physiologically present in the rat hippocampus. We showed, by electron microscopy, the presence of organelles that have the characteristics of MVBs: they are surrounded by an external membrane, and they contain intraluminal vesicles (ILV), with a mean size of 100nm (Figure 1A). Our observation, in line with another report (Cooney *et al*, 2002), strongly suggests that hippocampal cells could release EVs *in vivo*. Since our work was performed on *in vitro* preparation of hippocampal cells, we confirmed by electron microscopy that MVBs are also present in rat primary hippocampal cultures (Figure 1B).

Primary hippocampal cells in culture release exosome-like vesicles

To confirm that the ILVs observed in the MVB of primary hippocampal cultures are EVs, we performed an immunolabelling at the electron microscope level against CD63, an enriched-protein at the membrane of EVs (Pols & Klumperman, 2009; Kowal *et al*, 2016). We used the Tokuyashu method, where contrast is inverted and membranes appear in white. Figure 1C shows that some ILVs were positively labeled for CD63, and had the expected size of EVs (100nm in average). Thus, rat primary hippocampal cultures contained MVBs, and their presence was not an artifact of primary culture preparation because they were also present *in vivo*.

Then, we wanted to study the distribution of MVBs along the neuronal arborization. To answer this question, cultures were electroporated with a plasmid encoding for a CD63-GFP fusion protein. Then, we performed an immunolabeling against GFP showing that MVBs were present in the soma of hippocampal neurons and all along the dendrites (Figure 1D). Thus, hippocampal neurons in cultures should be able to release EVs from the soma and the dendrites.

Finally, we wanted to confirm that hippocampal cells in culture were able to release EVs. We electroporated these cultures with a plasmid encoding for a CD63-GFP fusion protein, and purified EVs from the medium culture with the ExoQuick solution (SBI), a well established purification method for EVs (Lobb *et al*, 2015). Then, we performed an immunolabeling against GFP by electron microscopy, and showed the presence in the culture medium of 100nm diameter vesicles, positively labeled for GFP and thus CD63-positive (Figure 1 E). These vesicles have the expected size and morphology of EVs.

To confirm the nature of the purified vesicles, we performed a proteomic analysis. Vesicles were purified from the culture medium or from filtered PBS as a negative control, then proteins were purified and analyzed by mass spectrometry. Figure 1F clearly shows that the samples corresponding to EV purification from culture medium contained significantly more exosomal proteins (190) than control samples (13), Fisher's test, $p < 0.001$.

In addition, to compare EVs purification procedures, we performed a western-blotting analysis of EVs purified either by ultracentrifugation or with ExoQuick solution. Ultracentrifugation is the most well-established method for EV purification and we used a protocol adapted to

neuronal primary cultures (Laulagnier *et al*, 2017). Well-known exosomal markers (CD63; Tsg-101; Lamp2 and syntenin-1) were detected in both EVs prepared with the ultracentrifugation protocol or with the ExoQuick solution (Figure 1G).

Altogether, these results clearly show for the first time that rat primary hippocampal cultures release EVs in the culture medium.

EVs released by hippocampal cultures contain miRNAs

Our hypothesis is that neuronal cells could communicate by exchanging miRNAs loaded in EVs. To validate this hypothesis, we have studied the miRNA content of EVs. We first wanted to confirm that miRNAs were present in EV from primary hippocampal cultures. Thus, we quantified 748 miRNAs referenced in miRBase in EVs and in the hippocampal cells by qRT-PCR from purified EVs, and studied. Statistical analysis of miRNA expression in hippocampal cells and EVs shows that 21 miRNAs were enriched in the EVs (Table 1).

Physiological neuron activation protocol

Our hypothesis was that vesicular miRNAs could be involved in the regulation of neuronal plasticity. If so, vesicular miRNA expression would have to be regulated in brain cells and EVs in response to neuronal activity changes.

In order to increase the activity of hippocampal primary cultures, two concentrations of potassium were tested. While superfusion of cultures with high potassium (25mM) aCSF induced a huge increase of cell membrane potential together with a complete blockade of spiking and synaptic activity (Supp. Figure 1), superfusion of cells with moderately increased

potassium concentrations (8mM) induced a durable reversible increase in cell spiking frequency (Figure 2A, one way repeated measure ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test, n=14). This increase in activity was maintained for at least 30 minutes (Figure 2B). Altogether, our data indicate that a moderate increase in extracellular K⁺ concentration is a sustainable and reliable way to increase cultured hippocampal neurons activity. Thus, all experiments involving neuronal activation were performed with a switch from a basal concentration of 5mM of extracellular KCl to a concentration of 8mM extracellular KCl during four hours.

Then, because intracellular calcium is the main second messenger in neurons and because intracellular calcium concentration is strongly correlated to neuronal activity, we performed intracellular calcium imaging experiment. Figure 2C clearly shows that there was three times more intracellular calcium in cells at 8mM KCl than at 5 mM KCl. To confirm that this protocol had an impact on neuronal activation we quantified the transcriptomic activity of neurons by measuring c-Fos levels. C-fos is a transcription factor mainly used to reveal neuronal activity (Kaczmarek & Nikołajew, 1990; Moore *et al*, 1996). Thus, we performed an immunocytochemistry against c-fos on cells treated with 5 or 8 mM KCl. Figure 2D shows that there was 3.5 times more cells expressing c-fos at 8 mM KCl than at 5mM KCl, confirming that this KCl treatment induced an increase in transcriptional activity. Altogether, these results confirmed that a 8mM KCl treatment for four hours was efficient to activate rat primary hippocampal cultures. Nevertheless, it has been shown that apoptosis increases exosomes release in the extracellular space. In order to verify that this KCl treatment did not induce apoptosis on primary brain cultures, we performed a Tunel assay. As a positive control we used cells treated with Dnase I, an enzyme that breaks DNA strands, mimicking apoptosis

signaling. Figure 2E shows that there was significantly more apoptotic cells in the positive control than at 5 mM or 8 mM KCl. More interestingly, there was no difference between 5mM and 8 mM KCl, meaning that this KCl treatment did not induce apoptosis in our hippocampal cultures.

miRNAs contained in EVs are regulated in response to neuronal activity

To assess if miRNAs expression were regulated by neuronal activity in cells and EVs, we treated hippocampal cultures with 5 mM or 8 mM KCl, purified EVs, and quantified miRNAs expression in the cells and in the EVs. Figure 3A shows an upregulation of 31 miRNAs and a downregulation of 11 miRNAs in cells after KCl treatment. In the same conditions 18 miRNAs were upregulated and 4 miRNAs downregulated in EVs (Figure 3B). To assess if the miRNAs contained in the EVs and released by cells were regulated in the same way as cellular miRNAs, we tried to correlate the expression of miRNAs in neurons and EVs. Figure 3C represents, for each miRNA, the fold change in response to neuronal activity increase both in cells (on the x-axis) and in the EVs (on the y-axis). Thus, in the upper right corner, are miRNAs whose expression was increased both in neurons and EVs in response to activity changes. As well, in the lower left corner, are miRNAs whose expression decreased both in cells and EVs in response to activity increase. Interestingly, in the upper left and the lower right corner, are miRNAs whose expression was oppositely regulated in cells and EVs. More precisely, in the upper left corner, in response to neuronal activity increase, the expression of a given miRNA was decreased in the cells but increased in the EVs. On contrary, in the lower right corner, the expression of miRNAs was increased in the cells and decreased in EVs. These results strongly suggest that there is an active packaging of specific miRNAs in EVs depending of neuronal activity.

Sequence-specific loading of miRNAs has already been described and should have a physiologic role for cell communication (Janas *et al*, 2015). Two studies found nucleotidic motifs specifically enriched in the miRNAs loaded in EVs, the so-called EXOmotifs (Villarroya-Beltri *et al*, 2013; Shurtleff *et al*, 2016). Thus, we performed a motif enrichment analysis on two different datasets, miRNAs enriched in EVs in basal conditions and miRNAs enriched in EVs after neuronal activation. We used the MEME software suite (Bailey *et al*, 2009) and searched already known EXOmotifs as well as *de novo* motifs. In basal conditions, each of the EXOmotifs GGAG, UGCA and ACCC were only found one time out of 21 miRNAs enriched in the EVs, which is not statistically significant. In activated neuron conditions, the GGAG and UGCA motifs were found once, while the ACCC motif was found twice in a total of 14 sequences, an enrichment still not statistically significant. Then, we searched for *de novo* motifs, unfortunately, we were not able to discover any new EXOmotif significantly enriched in these two datasets.

miRNA-containing EVs participate to inter-cellular communication in response to neuronal activity changes

Finally, we designed an experiment to evaluate the potential of miRNA-containing EVs in the inter-cellular communication in response to neuronal activity changes. Thus, we treated hippocampal neurons at either 5mM or 8 mM KCl, then purified secreted EVs, and added these EVs in the medium of non-activated hippocampal cultures (i.e 5mM KCl). Twenty-four hours after addition of the EVs, we extracted total RNA from the recipient cells, and sequenced total mRNAs by NGS (Figure 4A). We were able to measure the expression of 30 436 genes by NGS sequencing (Supp Table 1). Figure 4B is a representation of the statistical analysis of mRNA expression in hippocampal cultures treated with EVs coming from resting

or activated cells. This volcano plot shows that while the majority of genes were not affected by the treatment (black circles), a large number of genes were significantly down- or up-regulated (green and red circles, respectively). In particular, 194 and 337 genes were respectively down- and up-regulated in response to the treatment with EVs secreted by activated hippocampal cultures (Figure 4C). The log₂ of the fold change induced by EVs ranged from -3.93 to +3.98, suggesting an impact of EV-loaded miRNAs on recipient cells.

miRNA-containing EV regulate genes involved in neuronal physiology

To evaluate the role of miRNAs in the impact of EVs on gene expression in the recipient genes, we performed a correlative analysis of the EV-enriched miRNAs and the regulated genes. Thus, we predicted all mRNA targets of the miRNAs that were enriched in the EVs secreted by the activated hippocampal cultures with the Targetscan algorithm (Agarwal *et al*, 2015). Then, we did a correlation with the genes that were actually regulated after treatment with EVs from activated cells. Finally, we did Gene Ontology term analysis to highlight the biological processes potentially regulated by these EV-enriched miRNAs. To perform this analysis, we used the Metascape software (<http://metascape.org>) and we represented the data in Circos plots (Krzywinski *et al*, 2009). This analysis shows that among the genes that were regulated by EVs secreted by activated neurons, many are the targets of EV-enriched miRNAs (Figure 5). Interestingly, some mRNA were targeted by multiple miRNAs, for example Shank1, an adapter protein in the postsynaptic density of excitatory synapses, was targeted by miR-337-3p and miR-346. Globally, many of the regulated genes were related to biological processes involved in neuronal physiology. For instance, terms like “cell morphogenesis involved in neuron differentiation” and “dendritic spine development” were statistically enriched (Figure 5).

Discussion

Our work addressed the role of the miRNA-containing EVs as a new way of inter-cellular communication in the nervous system.

First, this study confirms the presence of miRNAs in EVs from primary hippocampal cultures. The study of the inter-cellular transfer of miRNAs by EVs is a hot topic, in particular in the immune system (van der Grein and Nolte-'t Hoen, 2014), cancers progression and metastasis mechanisms (Takahashi et al., 2017). In the nervous system, the presence of miRNAs in EVs was already mentioned, in EVs from glial cell cultures (Jovičić and Gitler, 2017), or from tumoral cells (Skog et al., 2008; van der Vos et al., 2016; Zhang et al., 2015). Our study demonstrates, rigorously for the first time, that hippocampal primary cultures release EVs containing miRNAs.

Our work demonstrates a different miRNA-content between cells and EVs, which was previously observed in other cell types (Guduric-Fuchs et al., 2012; Jenjaroenpun et al., 2013; Pigati et al., 2010; Skog et al., 2008), but never in primary hippocampal neurons. Among miRNAs specifically enriched in EVs compared to cells, 3 miRNAs were miR-30 family members : miR-30b, miR-30c and miR-30d. Interestingly, miR-30c is involved in axon guidance mechanisms in the murine olfactory bulb (Sun et al., 2014), and in adult murine neurogenesis (Sun et al., 2016). Moreover, miR-30b promotes axon outgrowth by inhibiting semaphorin A3 receptor (Han et al., 2015). So, our results suggest that EV-enriched miRNAs could be involved in axon guidance regulation. In addition, the brain-specific miR-134 is also enriched in EVs. This miRNA is well known for its capability to regulate dendritic spine size by inhibiting the expression of Limk1 (Schratt et al., 2006). Thus, it suggests that the exchange of

vesicular miRNAs could participate to the dendritic spine control, an important mechanism of synaptic plasticity. Another interesting EV-enriched miRNA is the miR-129 that was demonstrated to play a pivotal role in homeostatic plasticity at excitatory synapses (Rajman *et al*, 2017).

Interestingly, our work reveals for the first time that the miRNA-content of EVs is modified upon high neuronal activity. Indeed, even if this observation was already done upon depolarization of PC12 cells differentiated into neuronal cells (Goldie *et al.*, 2014), this is the first time that this result was obtained from primary neuronal cultures. This result, obtained in this more physiological model, reinforce the hypothesis of the exchange of vesicular miRNAs in the CNS as a new means of inter-cellular communication (Zappulli *et al.*, 2016).

Moreover, we optimized a physiological protocol to enhance neuronal activity in primary hippocampal cultures, and verified its efficiency and the viability of cells by a combination of electrophysiological recording, calcium imaging, and immunocytochemistry. Our protocol, consisted in increasing the extracellular concentration of the culture medium from 5 mM to 8 mM KCl. This treatment induced a durable, reversible, increase in cell spiking frequency, an intracellular calcium level increase, and did not induce cell death. This protocol is different from those already performed, which applied a higher extracellular concentration of KCl (Bahrini *et al.*, 2015; Fauré *et al.*, 2006; Goldie *et al.*, 2014), which, in our hands, induced a complete blockade of spiking and synaptic activity.

In addition, our results suggest that the incorporation of miRNAs in EVs is an active and selective process, which appears to be modulated by neuronal activity. Some studies proposed

the presence of a specific motif, called EXOmotif, involved in the loading of specific miRNAs in EVs (Shurtleff et al., 2016; Villarroya-Beltri et al., 2013). However, these motifs appear to be cell-type specific and we were not able to confirm this observation in our model. Based on our EV-enriched miRNAs we tried to find a *de novo* EXOmotif but no sequence reached the statistical significance to be considered as an EXOmotif. This result could be due to the low number of miRNAs that we found enriched in EVs. Future studies using small RNA-Seq instead of RT-qPCR to analyze the miRNA content of neuronal EVs may discover new miRNAs enriched in neuronal EVs and maybe a neuronal EXOmotif.

Finally, the addition of EVs from activated hippocampal cultures to the culture medium of control cultures led to a transcriptomic regulation of recipient cells. In particular, bioinformatic predictions and correlations suggest that miRNAs over-expressed in EVs upon high neuronal activity, regulate expression of genes involved in neuronal plasticity mechanisms. To our knowledge, this is the first demonstration of the role of miRNA-containing EVs in neuronal communication. To go further, it will be required to confirm, at the molecular level, the interaction and the regulation exerted by EV-enriched miRNAs on their predictive target genes. Finally, it would be very interesting to investigate this new way of communication *in vivo*.

Material and Methods

Cell culture and electroporation

All experimental procedures were approved by the local ethics committee. Hippocampal neuron cultures were prepared from E18 Sprague-Dawley rats following a previously described « banker » method (Goslin & Banker, 1989). Moreover, mixed cultures of hippocampal neurons, which consist in a mix of glial cells en neurons, were prepared from E18 Sprague-Dawley rats.

Time-mated animals were provided by a commercial provider and sacrificed by beheaded after anesthesia. Cells for « banker » method were plated at a density of $200 \cdot 10^3$ cells/ml on 1 mg/mL poly-L-lysine (Sigma) pre-coated coverslips, and cells for mixed cultures were plated at a density of $800 \cdot 10^3$ cells/wells in 6 wells plates, $150 \cdot 10^3$ cells/wells in 12 wells plates, and $1 \cdot 10^4$ in 18mm petri dishes. Cells were kept in serum free Neurobasal medium (Gibco) supplemented by 2 % Neurocult SM1 neuronal supplement (STEMCELLS technologies) and 2mM L-glutamine (Gibco), 8 uM AraC (Sigma) at 37°C in 5% CO₂ for 15 days in vitro (DIV). During this period a third of the medium was renewed weekly.

Electroporation

An amount of 1ug per 1 000 000 cells of plasmid encoding a CD63 tagged by GFP was introducing by electroporation using an Amaxa Nucleofector device (Lonza) following the manufacturer's suggested protocol. The program is CU-133 optimized for high cell viability.

EVs isolation

EVs were isolated from culture supernatants by centrifugation with ExoQuick solution (SBI),

following the manufacturer's protocol. EV pellets were washed by PBS, and immediately used for experiments.

In order to compare ExoQuick's purification with a classical method of purification, we purified vesicles from the culture supernatants by following instructions from optimized protocol (Laulagnier *et al*, 2017).

Electron microscopy

First, 5µl of purified exosomes are dropped off on carbon grid during 20min. The excess of solution is then absorbed on a wattman paper. Then, the grids were washed 5 times in PBS for 2 min each, then incubated 2 times 3 min in PBS buffer containing 1% BSA as a blocking step. Sections were floated for 1 h on a drop of primary antibody, anti-CD63 (*R-13*): *sc-31231* (*Ste Santa Cruz Biotechnology*) with a 1/10 and 1/40 dilution in PBS containing 1% BSA. After washing with 1% BSA in PBS, the samples were incubated with 15 nm colloidal gold-conjugated secondary antibodies donkey anti-goat (Aurion) diluted at 1/40 in 1% BSA/PBS. The ultra-thin cryo-sections were then fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 10 min to further stabilize them, followed by ten washes in distilled water, 1 min each. Finally, the cryo-sections were embedded in a thin film of methylcellulose containing 0.3% uranyl acetate and air-dried.

Tokuyasu method

Cells are cultivated in petri dishes, electroporated with a plasmid encoding CD63-GFP and chemically fixed with 4% PFA - 0.1%Ga in PB 0.1M pH 7.4 warm at 37°C for 1h at RT. Cells are then scrapped in glycine 50mM in PBS and centrifugated 10000 rpm for 5min. After several rinses, cells are re-suspension in 10% gelatin in PBS and centrifugation (10000 rpm for

5 min) followed by cooling to 4°C to form a pellet held in a gelatin matrix. 1mm³ blocks are then cutted and plunge in 2.3M sucrose on a wheel, at 4°C.

Sucrose infiltrated cells blocks are mounted on aluminium pins, plunged into liquid nitrogen and stored until further processing.

For cryo-sectioning, pins with frozen cells blocks were mounted in a cryo-ultramicrotome (Ultracut UC7/FC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Cells blocks were trimmed at -90°C with a cryotrim diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland) and ultrathin cryo-sections, 70 nm thick, were cut at -120°C with an immuno diamond knife (Diatome).

Sections were picked up with a drop containing an equal mixture of 2% methylcellulose and 2.3 M sucrose, warmed up to room temperature, and transferred onto a Formvar film-coated, 200 mesh copper finder grid (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

The temporary slide preparations were disassembled and immunogold labelling was performed to detect the GFP. First, the grids were washed 5 times in PBS for 2 min each, then incubated 10 min in PBS buffer containing 1% BSA as a blocking step. Sections were floated for 1 h on a drop of primary antibody, anti-CD63 (BD Pharmingen) diluted 1:20, 1:50 and 1:100 in 1% BSA in PBS. After washing with 1% BSA in PBS, the samples were incubated for 1 h with 6 nm colloidal gold-conjugated secondary antibodies, goat anti-mouse (Aurion) diluted 1:40 in 1% BSA/PBS. The ultra-thin cryo-sections were then fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 10 min to further stabilise them, followed by ten washes in distilled water, 1 min each. Finally, the cryo-sections were embedded in a thin film of methylcellulose containing 0.3% uranyl acetate

and air-dried.

Progressive Lowering of Temperature

Glass strips are fixed for 1 hr in 4% paraformaldehyde - 0.1% glutaraldehyde in PBS. They were gradually dehydrated in ethanol (30-50 (30min each)-70-95-100-100 (1h each)) during the decrease of the temperature (from 0°C to -35°C) and gradually embedded in Lowicryl HM20 (2:1, 1:1, 1:2 1h30 each) at -35°C. After a 24h in pure resin, polymerization under UV lamp occurs at -35°C for 48h.

Blocks were mounted in a cryo-ultramicrotome (Ultracut UC7/FC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria) and sectioned with a diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland) and ultrathin cryo-sections 70 nm thick were collected on Formvar film-coated, 200 mesh nickel finder grid (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

The grids were washed 5 times in PBS for 2 min each, then incubated 10 min in PBS buffer containing 1% BSA as a blocking step. Sections were floated for 1 h on a drop of primary antibody, *anti-CD63 (BD Pharmingen)* and *anti-HA (Covance)* diluted 1:20, and 1:40 in 1% BSA in PBS. After washing with 1% BSA in PBS, the samples were incubated for 1 h with 10 nm colloidal gold-conjugated secondary antibodies, goat anti-mouse (Aurion) diluted 1:40 in 1% BSA/PBS. The ultra-thin cryo-sections were then fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 10 min to further stabilize them, followed by ten washes in distilled water, 1 min each and finally air-dried.

Grids have been observed with the TEM Hitachi H7650, at 80kV, with the GATAN Orius

camera.

Mass spectrometry

Sample preparation

EVs were purified from culture media with ExoQuick solution (SBI), following the manufacturer's protocol. EV pellets were washed with PBS filtered at 0.22 μm and resuspended in 10 μL of PBS + 10 μL of Laemmli buffer 2X (Sigma). Samples were heated at 99°C for 10 min before migration on SDS-Page gel. Samples were loaded on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel. Migration was stopped when samples were entered the resolving gel and proteins were visualized by Colloidal Blue staining. Each SDS-PAGE band was cut into 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3), 50% Acetonitrile (ACN) and shrunk in ACN for 10 min. After ACN removal, gel pieces were dried at room temperature. Proteins were first reduced in 10 mM dithiothreitol, 100 mM NH_4HCO_3 for 30 min at 56°C then alkylated in 100 mM iodoacetamide, 100 mM NH_4HCO_3 for 30 min at room temperature and shrunken in ACN for 10 min. After ACN removal, gel pieces were rehydrated with 100 mM NH_4HCO_3 for 10 min at room temperature. Before protein digestion, gel pieces were shrunken in ACN for 10 min and dried at room temperature. Proteins were digested by incubating each gel slice with 10 ng/ μL of trypsin (T6567, Sigma-Aldrich) in 40 mM NH_4HCO_3 , 10% ACN, rehydrated at 4°C for 10 min, and finally incubated overnight at 37°C. The resulting peptides were extracted from the gel by three steps: a first incubation in 40 mM NH_4HCO_3 , 10% ACN for 15 min at room temperature and two incubations in 47.5 % ACN, 5% formic acid for 15 min at room temperature. The three collected extractions were pooled with the initial digestion supernatant, dried in a SpeedVac, and resuspended with 25 μL of 0.1% formic acid before nanoLC-MS/MS analysis.

nanoLC-MS/MS analysis

Online nanoLC-MS/MS analyses were performed using an Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC system (Thermo Scientific, USA) coupled to a nanospray Q-Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, USA). Ten microliters of each peptide extract were loaded on a 300 μm ID x 5 mm PepMap C₁₈ precolumn (Thermo Scientific, USA) at a flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. After 5 min desalting, peptides were online separated on a 75 μm ID x 25 cm C₁₈ Acclaim PepMap[®] RSLC column (Thermo Scientific, USA) with a 4-40% linear gradient of solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN) in 108 min. The separation flow rate was set at 300 nL/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 1.8 kV needle voltage. Data were acquired using Xcalibur 2.2 software in a data-dependent mode. MS scans (m/z 300-2000) were recorded at a resolution of $R = 70000$ (@ m/z 200) and an AGC target of 1×10^6 ions collected within 100 ms. Dynamic exclusion was set to 30 s and top 15 ions were selected from fragmentation in HCD mode. MS/MS scans with a target value of 1×10^5 ions were collected with a maximum fill time of 120 ms and a resolution of $R = 35000$. Additionally, only +2 and +3 charged ions were selected for fragmentation. Others settings were as follows: no sheath and no auxiliary gas flow, heated capillary temperature, 200°C; normalized HCD collision energy of 25% and an isolation width of 3 m/z .

Database search and results processing

Mascot, MS Amanda and Sequest algorithms through Proteome Discoverer 1.4 Software (Thermo Fisher Scientific Inc.) were used for protein identification in batch mode by searching against the UniProt *Rattus norvegicus* database (<http://www.uniprot.org/> ; 29 581 entries, release 2015_07) from <http://tritypdb.org/> website. Two missed enzyme cleavages were

allowed. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.02 Da. Oxidation of methionine, acetylation of lysine and deamidation of asparagine and glutamine were searched as dynamic modifications. Carbamidomethylation on cysteine was searched as static modification. Peptide validation was performed using Percolator algorithm (Käll *et al*, 2007) and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% False Positive Rate at peptide level. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD000000.

The presence of exosomal proteins was determined using Exocarta (Mathivanan & Simpson, 2009) and ExPasy databases.

RNA extraction

Total RNA was isolated from all samples using the miRNeasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s protocol, and then quantified using Nanophotometer pearl (Implen). An amount of 25 fmole per sample of cel-miR-39-3p *Caenorhabditis elegans* oligo-ribonucleotide was added at the same time into the Trizol reagent as a spike-in reference for further RT qPCR.

Next Generation Sequencing

3 dishes of mix cells were treated either with 5mM KCl, or with 8mM KCl aCSF for 4 hours to increase neuronal activity. EVs were purified and added on 3 wells of mix cells at 800 000 cells /well for 48h. Then, total RNA was extracted from in total 6 wells: 3 control conditions and 3 activated conditions.

RNA quality was analyzed using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), and RNA concentration was determined by spectrophotometry using Nanophotometer Pearl (Implen). RNA-Seq libraries from 1ug of RNA were created using SMARTer Stranded Total RNA Sample Prep kit (Clontech), following the manufacturer's procedure. Briefly, ribosomal RNA have been depleted from the samples. Then, RNA have been reverse transcribed in cDNA, the first-strand cDNA have been purified and amplified by PCR from adaptators.

cDNA libraries quality and concentration were determined using Agilent 2100 Bioanalyzer and the High Sensitivity DNA Chip from Agilent's High Sensitivity DNA Kit. Sequencing was performed by the Eurofins company (Ebersberg, Germany) on Illumina's HiSeq sequencer.

Bioinformatic analysis of NGS

The quality of RNA-Seq data was evaluated by FastQC software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Clean data were obtained by removing adaptaters with Cutadapt tool, and low-quality reads from the raw data. Furthers analysis have been performed with Cufflinks suite tool (Trapnell *et al*, 2010). Briefly, the reads from the 2 conditions were mapped against the *rattus norvegicus* genome reference downloaded from UCS Genome Browser assembly ID: m6, using TopHat program. Then the transcripts were assembled with Cufflinks program, and a final transcriptome is realized using Cuffmerge. The mapped reads are quantified with Cuffquant against the previous transcriptome. Finally, Cuffdiff (Trapnell *et al*, 2012) allows to evaluate the differential expression between the 2 conditions.

Quantitative real time PCR

50 ng of cDNA were synthesized using Ncode VILO miRNA cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed with 1 ng cDNA per well, using the Lightcycler LC480 II system (Roche), specific 768 rat known miRNA primer set (Forward : specific miRNA primer and Reverse : Universal primer, Qiagen) and SYBR Premix Ex Taq (Tli Rnase H Plus), Bulk, Takara (Clontech) according to manufacturer's instructions. The following conditions, 95°C for 5 s, followed by 35 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 20 s, 72°C for 20 s were used for the qRT-PCR. At least two biological replicates were used. A dissociation curve was generated at the end to verify that a single product was amplified. The Cp value of each miRNA was normalized against that of cel-miR-39-3p. The relative level of expression was calculated using the comparative $2^{-(\Delta\Delta C_p)}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

Cellular activity-induced protocol

At 15 DIV, total medium culture was removed and replaced by sterile aCSF 5mM KCl (NaCl 130,5 mM ; KCl 5 mM, MgSO₄ 1,3 mM ; KH₂PO₄ 1,2 mM ; HEPES 1,25 mM ; CaCl₂ 2,4 mM ; Glucose 10 mM ; NaHCO₃ 19,5 mM) . After one hour of cell recovery, cells were treated by 5mM KCl (basal condition) or 8mM KCl for 4 hours (KCl, VWR).

Electrophysiology

Electrophysiological measurements of cultured neurons (10-15j) were performed under the control of an Olympus BX51 microscope using a multiclamp 2B (Molecular devices). Patch pipettes (typically 7-11 Ω) were filled with appropriate pipette solution (in mM: KGlucuronate 120; KCl 20; CaCl₂ 0.1; MgCl₂ 1.3; EGTA 1; HEPES 10; GTP 0.1; cAMP 0.2; Leupeptin 0.1;

Na₂ATP 3; D-Manitol 177; pH 7.3). Neurons were bathed in Artificial Cerebro Spinal Fluid (ACSF, in mM: NaCl 130.5; KCl 3.8 or 6.8 or 48.8; CaCl₂ 2.4; NaHCO₃ 19.5; MgSO₄ 1.3; KH₂PO₄ 1.2; HEPES 1.25; glucose 10; pH 7.4 – equilibrated with 95%O₂-5%CO₂) with either low (5mM), medium (8mM) and High (50mM) potassium concentration. All experiments were performed at room temperature (21-22 °C). Analyses were performed with spike2 (CED)

Apoptosis test

After KCl treatment, tunel technique was performed with Click-it tunel Alexa Fluor Imaging Assay, (Invitrogen, Molecular Probes), by following the manufacturer's protocole. The observations were made under a fluorescence microscope (Axioplan 2 imaging, Zeiss), and pictures taken with NIS-Elements BR4.00.05 software. For each condition, 5 pictures by coverslips and 4 coverslips were taken. Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 5. Significance is accepted at p<0.05.

Immunocytochemistry

Cells were washed 5 min with PBS at 37°C, then fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 min at 37°C, washed with PBS, and permeabilized with PBS Tween-20 0,25 % for 30 min. Primary antibodies (anti-GFP, rabbit, 1/500, Invitrogen, anti-c-fos, rabbit, 1/500, Santa Cruz) were incubated 2 hours at R.T in PBS Tween-20 0.25 % + 1 % BSA (Sigma). Then cells were washed three times with PBS Tween-20 0.25 %, and incubated 2 hours at R.T with secondary antibody (anti-rabbit Alexa 488, 1/1000, Invitrogen A-11008). Cells were washed 3 times with PBS, and mounted on microscope glass slides using Dako. The observations were made under a fluorescence microscope (Axioplan 2 imaging, Zeiss), and pictures taken with NIS-Elements

BR4.00.05 software. Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 5. Significance is accepted at $p < 0.05$.

Calcium imaging

Cells were washed in PSB at 37°C, and then incubated 10 min at 37°C with Fluo4 (Invitrogen) in tyrode medium. Cells were washed 2 times in tyrode at 37°C. Cells were recorded at 5mM KCl into tyrode medium, then the medium were replaced by 8mM KCl tyrode medium, and replaced again by 5 mM KCl tyrode medium. The recordings were made under Eclipse Ti microscope, Nikon, and movies recorded with NIS-Elements BR4.00.05 software. Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 5. Significance is accepted at $p < 0.05$.

Western blotting

After ExoQuick purification or ultracentrifugation purification, the pellet had been resuspended into 50 uL of Laemli buffer 2X (Sigma) with 50 uL of 0,2 um filtered PBS. Proteins have been heated at 95 °C for 10 min, and then putted on ice. 15 uL of each sample were loaded into 10 wells stain-free 4-20 % acrylamide gels (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free gels, Biorad), and 8 uL of molecular weight buffer (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, ThermoFischer) was used. Migration had been performed into a Biorad MiniPROTEAN 3 Cell system, 1h at 150 mV (with a Biorad PowerPac Basic generator). Total protein had been revealed with the Chemidoc XRS + System (Biorad) before the transfer of proteins. Protein transfer has been performed on a Polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P) 1h at 100 mV. Then, the membranes have been washed 10 min with TBS 0,5% Tween (TBS-T), and blocked with TBS-T 5% milk 1 hour at room temperature. Primary antibodies (anti-CD63, mouse, 1/500, BD Pharmingen; anti syntenin-1, mouse, 1/200, Santa

Cruz; anti Tsg-101, mouse, 1/1000, Gene Tex; anti Lamp2, rabbit, 1/500, Thermo Fischer; and anti tubulin, mouse, 1/5000, Sigma) have been diluted into TBS-T 2,5 % milk, and applied overnight at 4°C. Then, membranes were incubated 1h at room temperature, washed 3 times 5 min with TBS-T, and incubated with secondary antibodies (easy-blot anti mouse IgG HRP, GeneTex; Easy-blot anti rabbit IgG HRP, GeneTex) 2h at room temperature. The membranes were washed 3 times 5 min with TBST, and 2 times 5 min with TBS. Membranes have been revealed with SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fischer) according to the manufacturer's protocol, on the Chemidoc XRS + System (Biorad). Images have been treated with Image lab software (Biorad).

Acknowledgements

Anaïs Soula was funded by the French Ministry for Research and the Fondation pour la recherche médicale. We are grateful to Alexis Groppi and Macha Nikolski from the CbiB for their help for RNA-Seq analysis. We are also grateful to Sebastien Benquet for his technical help.

References

- Abels ER & Breakefield XO (2016) Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**: 301–312
- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W & Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* **4**:
- Aksoy-Aksel A, Zampa F & Schratt G (2014) MicroRNAs and synaptic plasticity--a mutual relationship. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**:
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW & Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**: W202-208
- Bakhti M, Winter C & Simons M (2011) Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.* **286**: 787–796
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281–297
- Budnik V, Ruiz-Cañada C & Wendler F (2016) Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**: 160–172
- Caroni P, Donato F & Muller D (2012) Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**: 478–490
- Chaput N & Théry C (2011) Exosomes: immune properties and potential clinical

implementations. *Semin. Immunopathol.* **33**: 419–440

Chivet M, Javalet C, Laulagnier K, Blot B, Hemming FJ & Sadoul R (2014) Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J. Extracell. Vesicles* **3**: 24722

Colombo M, Raposo G & Théry C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**: 255–289

Constals A, Penn AC, Compans B, Toulmé E, Phillipat A, Marais S, Retailleau N, Hafner A-S, Coussen F, Hosy E & Choquet D (2015) Glutamate-induced AMPA receptor desensitization increases their mobility and modulates short-term plasticity through unbinding from Stargazin. *Neuron* **85**: 787–803

Cooney JR, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM & Fiala JC (2002) Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22**: 2215–2224

Cotman CW & Nieto-Sampedro M (1984) Cell biology of synaptic plasticity. *Science* **225**: 1287–1294

Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J & Sadoul R (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**: 642–648

Gao J, Wang W-Y, Mao Y-W, Gräff J, Guan J-S, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC & Tsai L-H (2010) A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* **466**: 1105–1109

- Goslin K & Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* **108**: 1507–1516
- Gosselin R-D, Meylan P & Decosterd I (2013) Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters: regulation by protein kinase C and cell activation. *Front. Cell. Neurosci.* **7**: 251
- Harding C, Heuser J & Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**: 329–339
- Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C & Freyssinet J-M (2005) Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiol. Bethesda Md* **20**: 22–27
- Janas T, Janas MM, Sapoń K & Janas T (2015) Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Lett.* **589**: 1391–1398
- Kaczmarek L & Nikolajew E (1990) c-fos protooncogene expression and neuronal plasticity. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **50**: 173–179
- Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS & MacCoss MJ (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* **4**: 923–925
- Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R, Gherbesi N & Budnik V (2009) Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* **139**: 393–404
- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M & Théry C (2016) Proteomic comparison defines novel markers to

characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: E968-977

Krämer-Albers E-M, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Möbius W, Berger H, Nave K-A, Schild H & Trotter J (2007) Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin. Appl.* **1**: 1446–1461

Krämer-Albers E-M & Hill AF (2016) Extracellular vesicles: interneural shuttles of complex messages. *Curr. Opin. Neurobiol.* **39**: 101–107

Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ & Marra MA (2009) Circo: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* **19**: 1639–1645

Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, Blot B, Haase G, Goldberg Y & Sadoul R (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**: 409–418

Laulagnier K, Javalet C, Hemming FJ & Sadoul R (2017) Purification and Analysis of Exosomes Released by Mature Cortical Neurons Following Synaptic Activation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1545**: 129–138

Letellier M, Elramah S, Mondin M, Soula A, Penn A, Choquet D, Landry M, Thoumine O & Favereaux A (2014) miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling. *Nat. Neurosci.* **17**: 1040–1042

Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time

quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–8

Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegmans AP, Leimgruber A & Möller A (2015) Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles* **4**: 27031

Lopez-Verrilli MA & Court FA (2013) Exosomes: mediators of communication in eukaryotes. *Biol. Res.* **46**: 5–11

Mathivanan S & Simpson RJ (2009) ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* **9**: 4997–5000

Moore AN, Waxham MN & Dash PK (1996) Neuronal activity increases the phosphorylation of the transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) in rat hippocampus and cortex. *J. Biol. Chem.* **271**: 14214–14220

Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD & Thomson AW (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* **104**: 3257–3266

Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G & D'Souza-Schorey C (2009) ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr. Biol. CB* **19**: 1875–1885

Pan BT & Johnstone RM (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**: 967–978

- Pols MS & Klumperman J (2009) Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* **315**: 1584–1592
- Potolicchio I, Carven GJ, Xu X, Stipp C, Riese RJ, Stern LJ & Santambrogio L (2005) Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**: 2237–2243
- Rajman M, Metge F, Fiore R, Khudayberdiev S, Aksoy-Aksel A, Bicker S, Ruedell Reschke C, Raof R, Brennan GP, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Bauer S, Norwood B, Veno MT, Krüger M, Braun T, Kjems J, Rosenow F, Henshall DC, et al (2017) A microRNA-129-5p/Rbfox crosstalk coordinates homeostatic downscaling of excitatory synapses. *EMBO J.* **36**: 1770–1787
- Regehr WG, Carey MR & Best AR (2009) Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron* **63**: 154–170
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M & Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**: 283–289
- Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV, Ri S & Schekman R (2016) Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife* **5**:
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, 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**: 1470–1476

Stogsdill JA & Eroglu C (2017) The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **42**: 1–8

Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V & Schwartz AL (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* **65**: 417–427

Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M & Milligan CE (2007) Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev. Neurobiol.* **67**: 1815–1829

Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O & Amigorena S (2002) Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* **3**: 1156–1162

Tkach M & Théry C (2016) Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**: 1226–1232

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL & Pachter L (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**: 562–578

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ & Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**: 511–515

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ & Lötvall JO (2007) Exosome-mediated

transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**: 654–659

Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M & Sánchez-Madrid F (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* **4**: 2980

van der Vos KE, Abels ER, Zhang X, Lai C, Carrizosa E, Oakley D, Prabhakar S, Mardini O, Crommentuijn MHW, Skog J, Krichevsky AM, Stemmer-Rachamimov A, Mempel TR, El Khoury J, Hickman SE & Breakefield XO (2016) Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro-Oncol.* **18**: 58–69

Zhang G & Yang P (2017) A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *J. Neurosci. Res.*

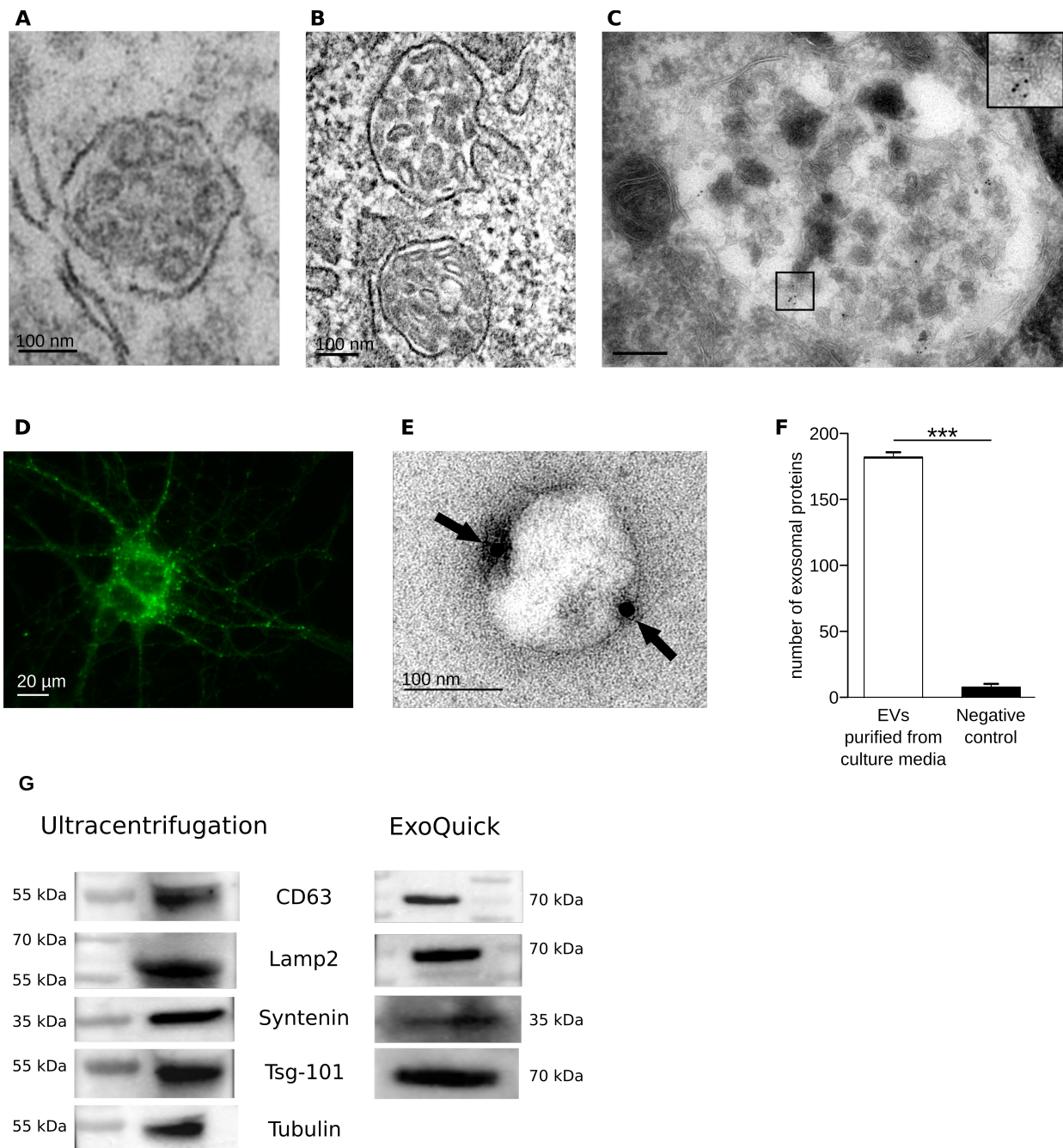


Figure 1: Hippocampal primary cultures release EVs.

A: Electron microscopy picture of an MVB in the rat hippocampus region. **B:** Electron microscopy picture of an MVB in rat primary cultures cells. **C:** CD63 labeling at the electron microscopy level with the Tokuyasu method, inset: CD63 positive ILVs. **D:** CD63 distribution in hippocampal neurons as revealed by immunocytochemistry against GFP after electroporation with a plasmid encoding a CD63-GFP fusion protein. **E:** CD63 labeling of EV at the electron microscopy level. Rat primary cultures were electroporated with a plasmid encoding a CD63-GFP fusion protein. EVs were purified with ExoQuick and deposited on grids. GFP expression is revealed by immunocytochemistry. **F:** Quantification of exosomal proteins. EVs were purified with ExoQuick from culture medium or filtered PBS as control. Proteins were extracted and analyzed by mass spectrometry. Then, exosomal proteins were categorized with the Exocarta and Expsasy databases (Fisher's exact test, p-value < 0,05). **G:** Presence of exosomal markers in EVs purified by ultracentrifugation or with ExoQuick. Common exosomal markers were revealed by western blot.

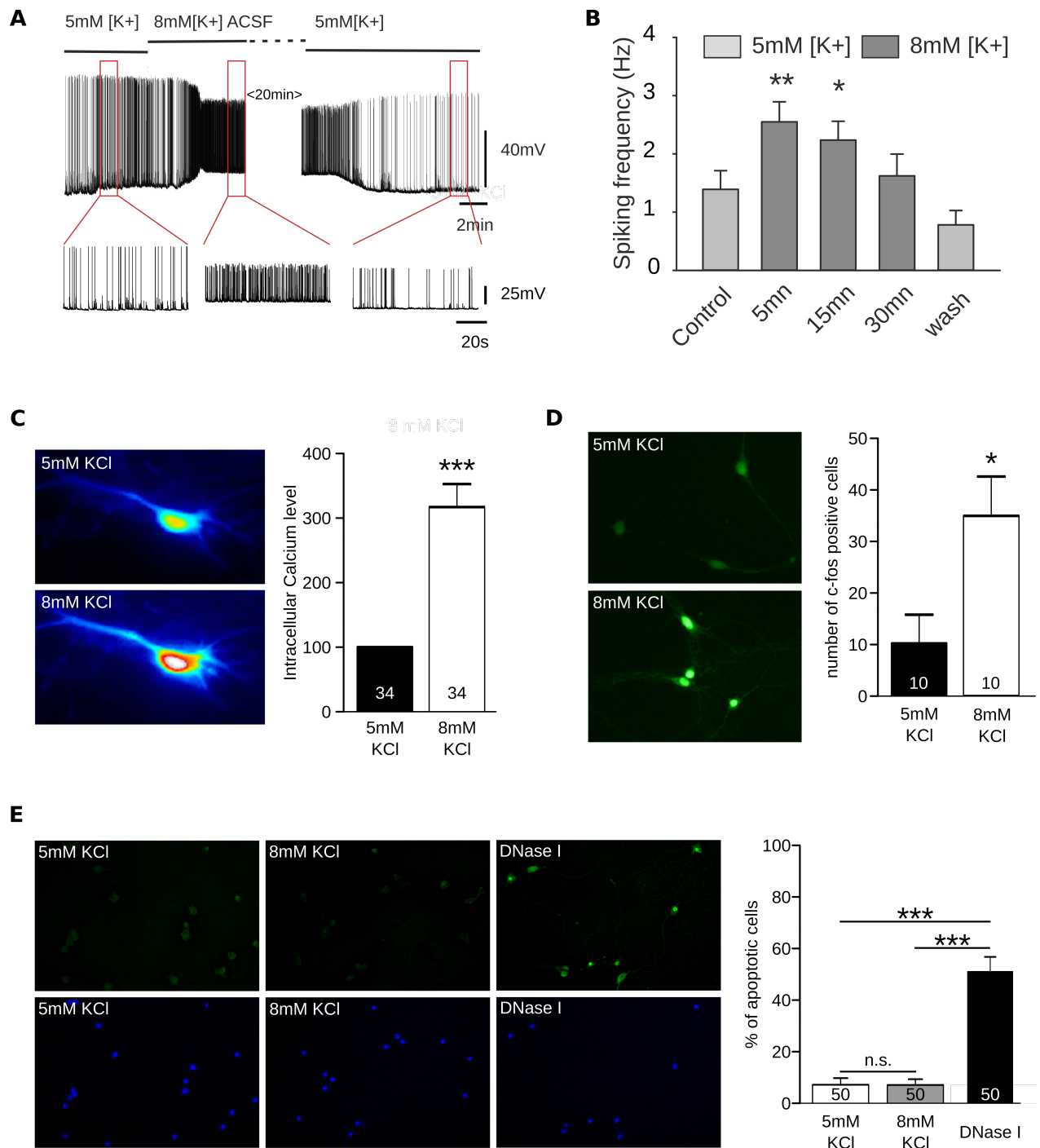


Figure 2: Optimization of a protocol to activate neuronal activity in primary hippocampal neurons.

A: Current clamp recordings of spontaneous electrical activity of a cultured hippocampal neurons in 5mM, 8mM and back to 5mM potassium. Larger scale enlargement of highlighted/boxed regions are provided below main trace. **B:** Quantification of average spiking frequency in these neurons in control condition, and at different time points after 8mM potassium aCSF superfusion. (** $p < 0.01$, * $p < 0.1$, one way repeated measure ANOVA followed by Dunnett's) **C:** Calcium imaging in neuronal cells (t-test, p -value $< 0,05$). **D:** Immunocytochemistry against c-fos gene (t-test, p -value $< 0,05$). **E:** TUNEL assay shows no difference in the apoptosis level between 5mM and 8mM KCl treatments but significantly more in DNase I treated neurons (Kruskal-Wallis followed by Dunn's posthoc test, $p < 0.001$).

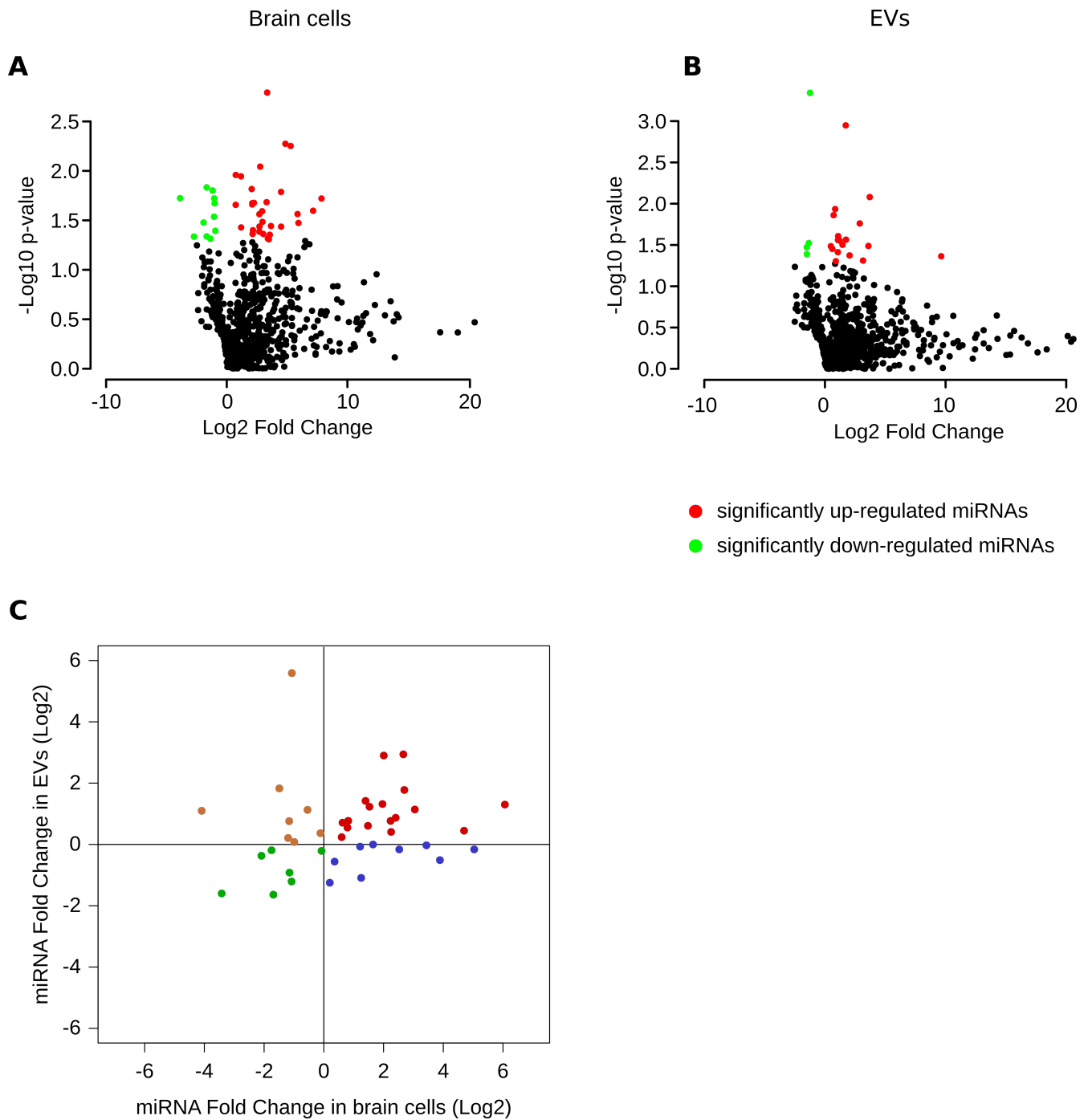


Figure 3: miRNA content in EVs varies in cells and EVs upon neuronal activation.

A, B: Volcano plot representing miRNA fold change in brain cells and EVs respectively, after the KCl treatment. The colors correspond to the following: black: non-regulated miRNAs; red: up-regulated miRNAs ; green: down-regulated miRNAs (Wilcoxon's test, p -value $< 0,05$). **C:** Correlation of the miRNA fold change between cells and EVs.

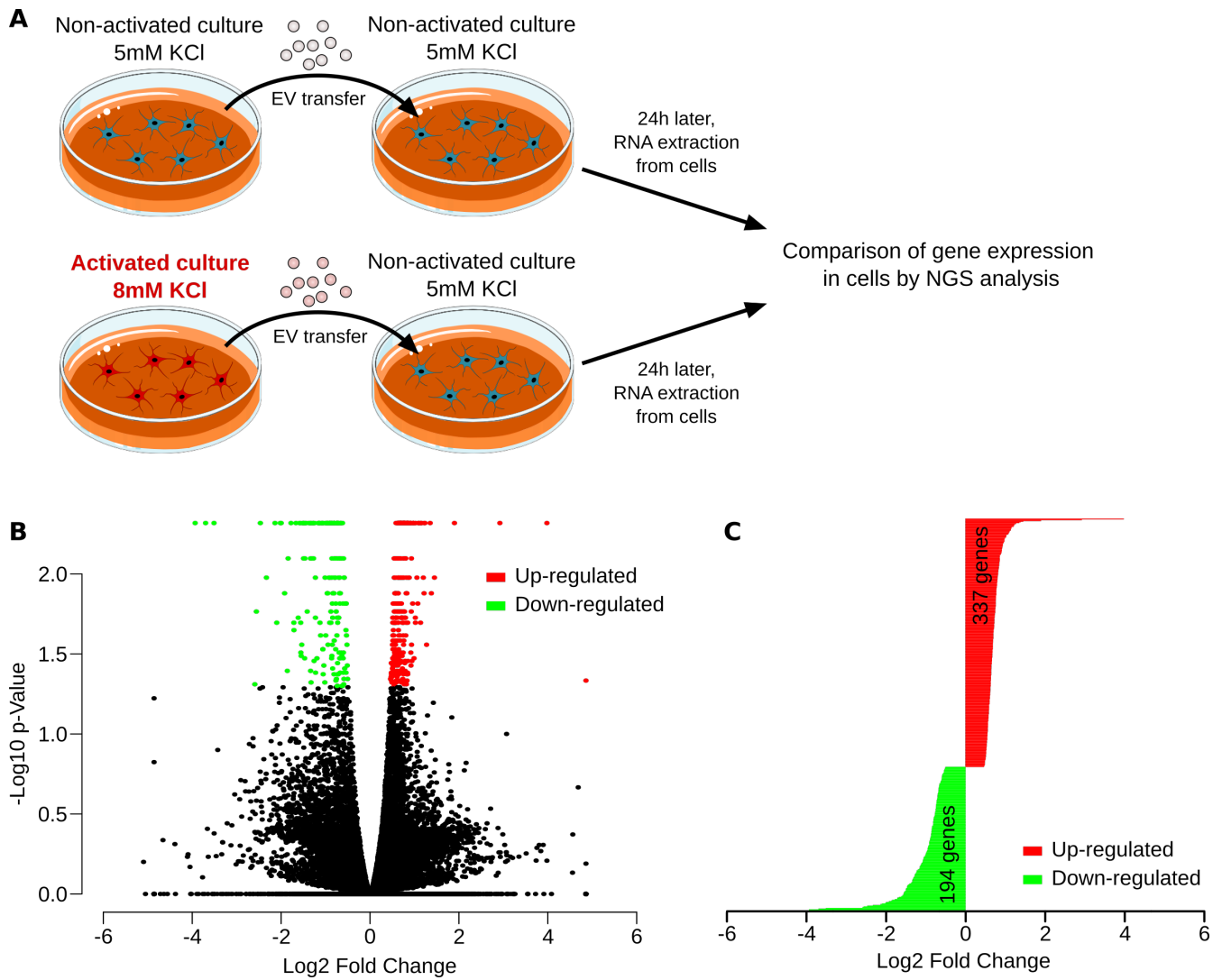


Figure 4: Vesicular miRNAs participate to the regulation of neuronal plasticity mechanism.

A: Schematic representation of the experiment. Cultures were treated or not with 8 mM KCl to enhance neuronal activity. EVs were purified, and added in the medium of non-activated hippocampal cells. One day after, total RNA was extracted from recipient cells, and the transcriptome was analyzed by NGS. **B:** Volcano-plot of the fold-change of genes in recipient cells. The colors correspond to the following: black: non-regulated genes; red: up-regulated genes; green: down-regulated genes (Wilcoxon's test, p-value <0,05). **C:** Representation of the fold-change of significantly down-regulated and up-regulated genes (green and red respectively).

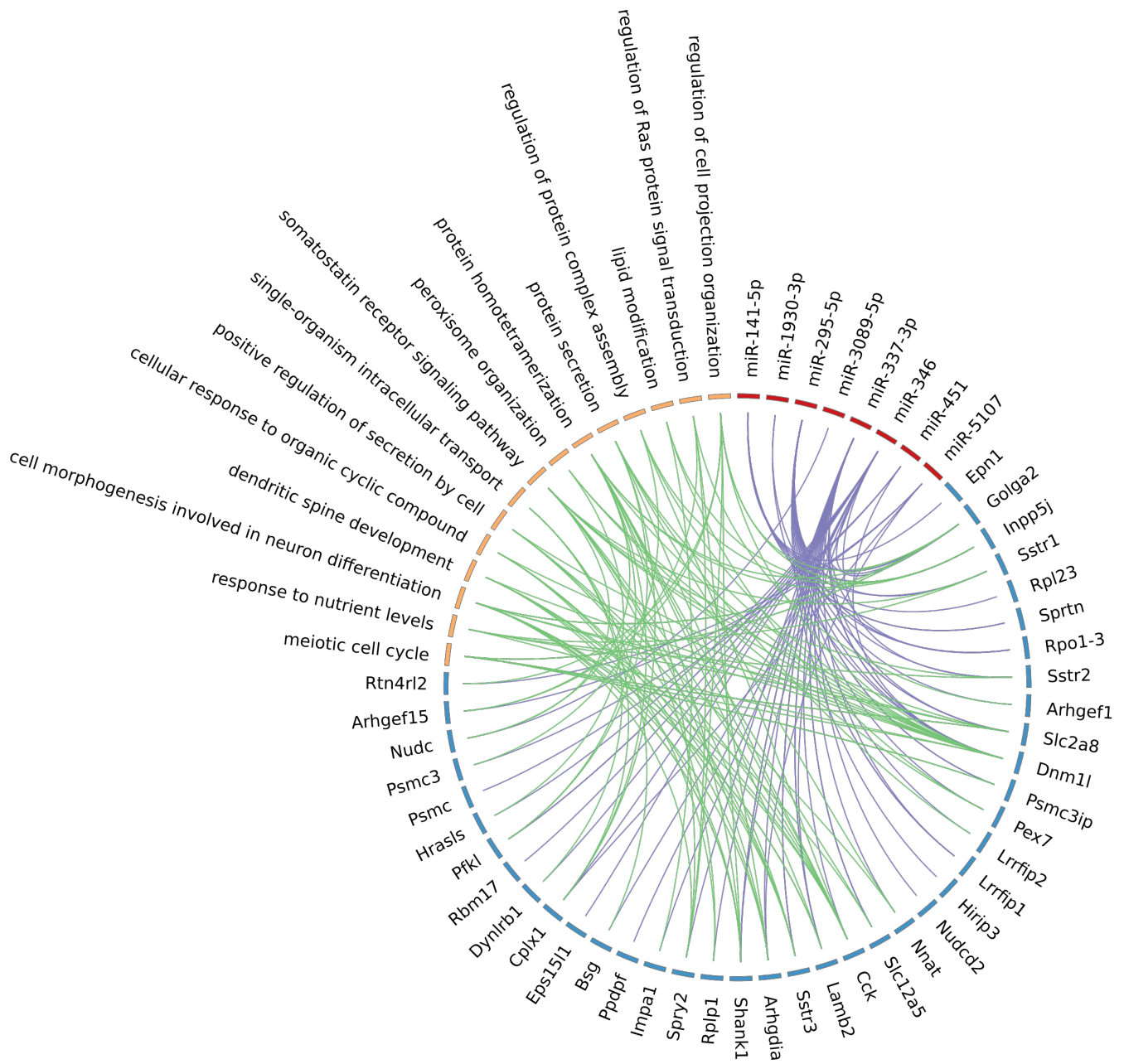


Figure 5: EV-enriched miRNAs after KCl treatment regulate genes in recipient cells involved in neuronal plasticity mechanisms.

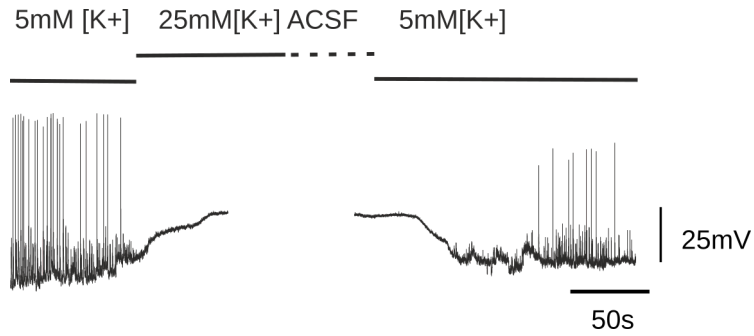
The circos plot represents target predictions between miRNA-enriched in EVs at 8mM KCl, regulated genes in recipient cells and associated GO terms. The colors correspond to the following: red: miRNAs enriched in EVs after KCl treatment; blue: predictive target genes actually regulated after KCl treatment; orange: GO terms; purple: link between miRNAs and predictive correlated target genes; green: link between genes and their associated GO terms.

Tables

miRNA name	sequence
miR-592	AUUGUGUCAUAUUGCGAUGAUGU
miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUCUUCUG
miR-300-5p	UUGAAGAGAGGUUAUCCUUUGU
miR-129-1-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAAGUAU
miR-154-3p	AAUCAUACACGGUUGACCUAUU
miR-190b-5p	UGAUUUGUUUGAUUUGGGUU
miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG
miR-30d	UGUAAACAUCCCGACUGGAAG
miR-129-2-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAAGCAU
miR-503	UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG
miR-335	UCAAGAGCAUAACGAAAAAUGU
miR-30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
miR-709	GGAGGCAGAGGCAGGAGGA
miR-762	GGGGCUGGGGCCGGACAGAGC
miR-30b	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU
miR-369-5p	AGAUCCGACCGUGUUAUAUUCGC
miR-207	GCUUCUCCUGGCUCUCCUCCUC
miR-15b-3p	CGAAUCAUUUUUGCUCUCUA
miR-212-3p	UACAGUCUCCAGUCACGGCCA
miR-190	UGAUUUGUUUGAUUUAUUAGGU
let-7b-3p	CUAUACAACCUACUGCCUCC

Table 1: miRNAs enriched in EVs compared to cells in basal conditions

Supplemental figures



Supplemental figure 1: 25 mM KCl treatment does not activate neuronal activity.

Current clamp recordings of spontaneous electrical activity of a cultured hippocampal neuron in 5mM, 25mM and back to 5mM potassium. Notice the huge depolarization induced by 25mM potassium as well as the complete blockade of synaptic and spiking activity.

3. Discussion et perspectives.

Notre travail confirme que les cellules du SNC en culture primaire libèrent des EVs. De plus, nous montrons que les EVs contiennent des miARNs, et de manière intéressante, que la composition en miARNs varie selon l'activation neuronale. Aussi, nous démontrons que l'ajout d'EVs issues de cultures activées, régule dans les cellules receveuses l'expression de gènes impliqués dans la plasticité neuronale. Nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'échange de miARNs vésiculaires participe à la régulation de la plasticité neuronale.

3.1. Les cellules du SNC libèrent des EVs : localisation, dynamique ?

Notre étude confirme que les cultures primaires de cellules d'hippocampe libèrent des EVs dans le milieu extracellulaire. De plus, nous validons la présence d'un organelle spécifique, le MVB, responsable de la libération d'un type d'EVs : les exosomes, dans les neurones d'hippocampe en tranche et en culture (Cooney et al., 2002).

Les neurones et les cellules gliales sont des cellules très polarisées, constituées d'un corps cellulaire et de longs prolongements. La structure de ces cellules est en étroite corrélation avec leurs fonctions. Nos résultats montrent que les MVBs sont présents dans le corps cellulaire et les prolongements des neurones. Nos observations sont en concordance avec d'autres publications, qui montrent également la présence de MVBs principalement dans les corps cellulaires des neurones et dans les dendrites, et de manière moins fréquente dans les axones (Altick et al., 2009). De manière intéressante, de nombreuses études localisent les MVBs dans les régions post-synaptiques (Chicurel and Harris, 1992; Cooney et al., 2002; Rind et al., 2005), laissant penser qu'ils joueraient un rôle dans les phénomènes de plasticité synaptique (Von Bartheld and Altick, 2011). Cela nous mène à penser que la libération des exosomes par les cellules neuronales est un phénomène contrôlé par la localisation, et le transport à la membrane des MVBs, dans lesquels ils sont enfermés. A ce propos, la kinésine KIFC2 est exprimée spécifiquement dans les neurones, et semble responsable du transport des MVBs le long des filaments du cytosquelette dans le corps cellulaire et les dendrites (Saito et al., 1997). En revanche cette kinésine est absente dans les axones (Saito et al., 1997). Une étude sur la localisation de la libération des exosomes dans les neurones mérite d'être réalisée.

D'autre part, l'activité des neurones varie beaucoup et cela a un impact sur leur efficacité de communication. Il a aussi été montré que la taille des MVBs dans les neurones s'accroît lors d'une forte activité neuronale (Von Bartheld and Altick, 2011), ce qui laisse penser que la synthèse des ILVs et donc des exosomes augmente. Il serait donc pertinent de regarder **1)** si la dynamique de libération des EVs est dépendante de l'activité neuronale, **2)** si la quantité d'EVs libérées augmente avec l'activité neuronale.

Notre équipe a récemment investi dans l'achat d'un appareil qui permet de quantifier les EVs : un qNano de chez Izon. Nous sommes actuellement en cours de mise au point de l'appareil pour quantifier les EVs purifiées à partir de cultures primaires d'hippocampe.

Pour répondre aux questions de localisation et de dynamique de libération, nous avons développé un outil qui consiste à exprimer la protéine CD63, exprimée à la surface des EVs, marquée d'une SEP en extravésiculaire et d'une mCherry en intravésiculaire (Figure 28A et B). La fluorescence de la SEP (*super ecliptic pHluorine*) est dépendante du pH : à pH acide, celle-ci n'émet pas de fluorescence, alors qu'à pH neutre, elle émet de la fluorescence. Ainsi, dans les MVBs, dont le pH est acide, les exosomes émettent uniquement de la fluorescence rouge grâce à la mcherry. Nous pouvons donc localiser les MVBs. Lors de la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire, la SEP se retrouve dans un milieu à pH neutre, et émet de la fluorescence verte (Figure 28 C). Les exosomes libérés apparaissent donc jaunes. Nous avons validé l'outil dans des cultures primaires d'hippocampe, il est ainsi prêt à être appliqué. Nous proposons de réaliser cette expérimentation à l'aide de la microscopie TIRF (*total internal inflection fluorescent microscopy*), technique maîtrisée par David Perrais, collaborateur de l'Institut. Cette technique de microscopie pénètre peu profondément dans les cellules, et permet donc de se concentrer sur les événements qui se réalisent à la membrane plasmique (Axelrod et al., 1983). Grâce à cela, nous pourrions étudier la localisation sub-cellulaire de libération des exosomes, ainsi que sa dynamique en condition basale et activée.

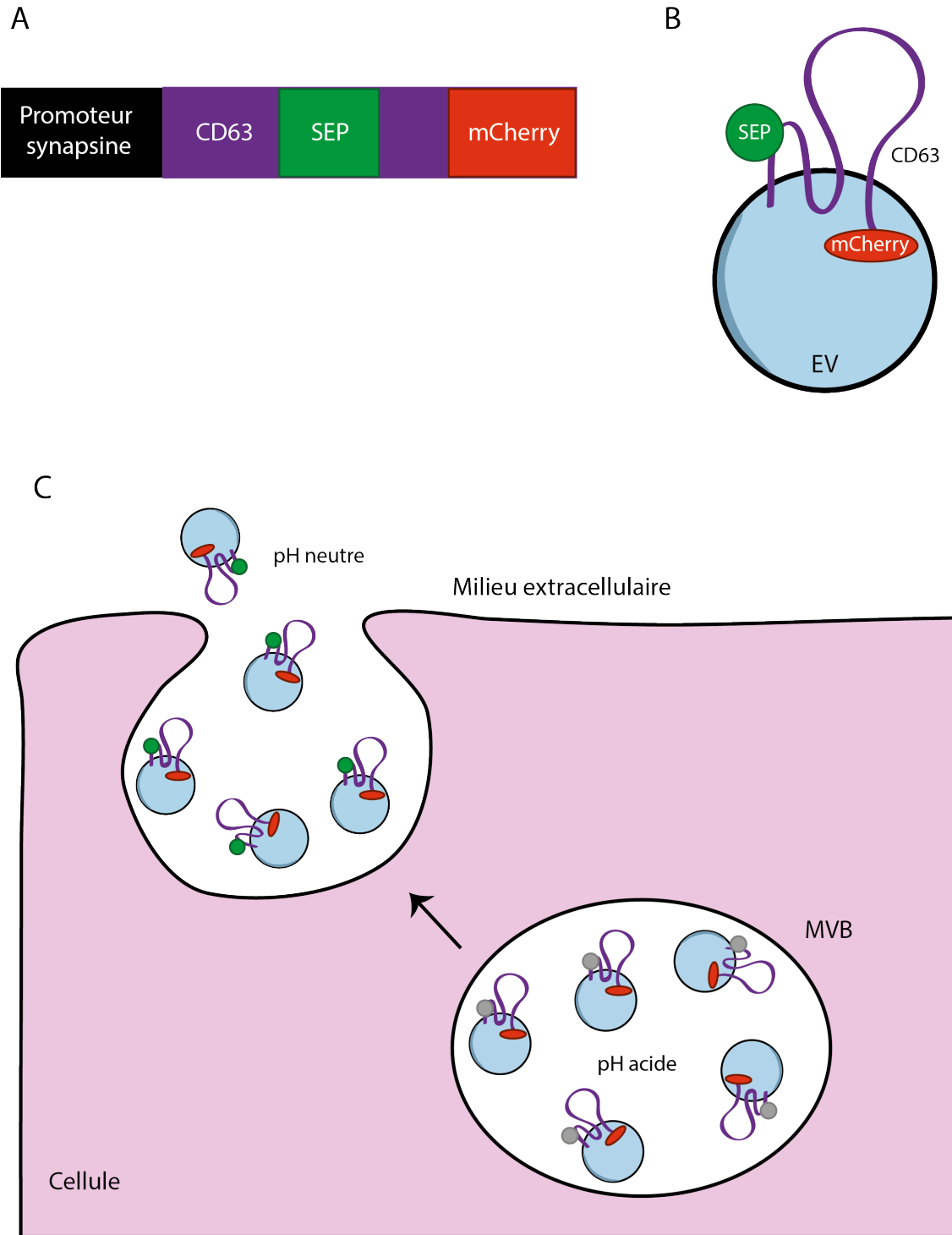


Figure 28 : Représentation du principe de la construction CD63-SEP-mCherry.

A : Représentation schématique de la construction plasmidique synapsine-CD63-SEP-mCherry. Le promoteur synapsine restreint l'expression de la protéine dans les neurones. La protéine CD63 est une tétraspanine exprimée à la surface des EVs. La SEP est une GFP modifiée, dont la fluorescence dans le vert dépend du pH du milieu : à pH acide, la fluorescence est inhibée, alors qu'à pH neutre, la fluorescence est active. La mCherry est une protéine fluorescente, qui émet dans le rouge. **B : Représentation schématique de l'expression de la construction.** La protéine CD63 est

composée de 2 boucles extravésiculaires. La SEP a été intégrée dans la petite boucle, et est sensible au pH du milieu dans lequel résident les EVs. La mCherry a été ajoutée sur une extrémité terminale de la protéine CD63, en position intravésiculaire. **C : Représentation du mode de fonctionnement de l'outil CD63-SEP-mCherry.** Dans le MVB, les exosomes résident dans un milieu acide, qui inhibe l'émission de la fluorescence de la SEP. Ainsi, seule la fluorescence rouge émise par la mCherry est détectable. Lorsque les exosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire, de pH neutre, la SEP émet de la fluorescence dans le vert. Ainsi, l'action de libération des exosomes est reconnaissable grâce à une émission de fluorescence jaune (combinaison des émissions dans le vert par la SEP et dans le rouge par la mCherry).

3.2. Développement d'un protocole d'activation neuronal physiologique dans les cultures primaires.

Les enregistrements électrophysiologiques préliminaires que nous avons réalisés (Dr Yves Le Feuvre) ont montré que les protocoles d'activation neuronale utilisés précédemment dans la littérature n'étaient pas optimaux. Plus particulièrement, les concentrations de KCl sont très élevées : 3h avec 25 mM de KCl (Bahrini et al., 2015; Fauré et al., 2006), et 100 mM KCl pendant quelques minutes à plusieurs reprises (Goldie et al., 2014).

Bien que ces concentrations de KCl entraînent une dépolarisation neuronale, celle-ci est trop importante et bloque finalement toute activité neuronale, tout du moins dans notre modèle de culture primaire d'hippocampe. Par conséquent, nous avons optimisé un protocole plus physiologique, qui consiste à un traitement extracellulaire de KCl de 8mM pendant 4 heures.

Par ailleurs, nos premiers tests d'enregistrements électrophysiologiques ont également révélé que le milieu de culture que nous utilisons (*Neurobasal medium*, Gibco) et dans lequel nous pratiquons le protocole d'activation, inhibait l'activité neuronale. Notre constatation fait écho à une étude qui a comparé l'activité synaptique de neurones humains en culture dans différents milieux de culture, dont le Neurobasal (Bardy et al., 2015). Pour résoudre ce problème, nous avons effectué les expériences d'activation neuronale dans de l'aCSF (*artificial cerebrospinal fluid*) 5mM ou 8mM KCl.

Suite à notre traitement, il existe une augmentation de la dépolarisation des neurones, de la concentration intracellulaire dans les neurones, et de leur activité, associées

à très peu de mort cellulaire. Des étapes d'optimisations supplémentaires pourraient être réalisées notamment sur le temps d'application du traitement.

3.3. L'étude des miARNs contenus dans les EVs : un sujet complexe.

Notre étude valide la présence de miARNs dans les EVs libérées par les cellules du SNC, et montre pour la première fois que le contenu en miARNs dépend de l'activité neuronale. Nous suggérons également que les EVs issues de cellules activées régulent l'expression de gènes impliqués dans la plasticité neuronale. Cette démonstration mène à l'hypothèse que l'échange des miARNs vésiculaires participe aux mécanismes de régulation de la plasticité neuronale. Notre travail s'inscrit dans une période au cours de laquelle l'intérêt pour les miARNs vésiculaires est grandissant. Néanmoins, l'étude de ce sujet est délicate, et nécessite de prendre quelques précautions.

En effet, plusieurs techniques de purification des EVs (elles seront évoquées au chapitre 4), comme l'ultracentrifugation ou les solutions de précipitation, co-purifient d'autres structures associées à des ARNs, comme les larges complexes de protéines et les lipoprotéines (Vickers et al., 2011). En particulier, les ARNs associés aux lipoprotéines sont résistants aux traitements de RNase, et peuvent libérer les miARNs dans des cellules receveuses (Vickers et al., 2011). Ainsi, des étapes additionnelles de purification sont conseillées (Tkach and Théry, 2016), comme la flottaison dans un gradient de densité, ou encore la purification par des anticorps spécifiques, avant d'annoncer un transfert de miARNs via des EVs (Lötvall et al., 2014). Notre travail est dans cette situation, car nous avons utilisé une solution de précipitation commerciale. Ainsi, nous devons réaliser quelques contrôles supplémentaires pour confirmer que les miARNs sont réellement associés à des EVs.

D'autre part, la nature (mature, précurseur) et l'état (associé ou non au complexe RISC) des miARNs contenus dans les EVs sont des paramètres déterminants pour la réalisation et la vitesse de la régulation dans les cellules receveuses. En effet, un miARN mature déjà incorporé dans le complexe RISC est potentiellement efficace immédiatement dans la cellule receveuse, alors qu'un miARN sous sa forme de précurseur devra préalablement être pris en charge par Dicer pour être mûré. Dans notre étude, nous révélons la présence de miARNs dans les EVs à l'aide de la technique de RT qPCR, en utilisant une amorce qui reconnaît la séquence mature des miARNs d'intérêts. Nous postulons donc que les miARNs sont présents sous leur forme mature, mais nous ne

proposons pas de démonstration formelle. Pour vérifier notre hypothèse, il serait intéressant d'étudier la présence de la protéine AGO, membre du complexe RISC, dans les EVs. Ce sujet est d'autant plus intéressant que la littérature qui s'y consacre est hétérogène. En effet, certaines études montrent que AGO co-localise avec les MVBs (Gibbins et al., 2009; Lee et al., 2009) ou les microvésicules (Li et al., 2012a), alors que d'autres études ne la retrouvent pas dans les EVs (Shurtleff et al., 2016), ou démontrent que les miARNs qui sont co-purifiés avec la protéine AGO dans le milieu extracellulaire sont majoritairement hors des vésicules (Arroyo et al., 2011; Koppers-Lalic et al., 2014; Turchinovich et al., 2011).

Un autre paramètre important à prendre en compte dans le concept de la régulation de la cellule receveuse de miARNs vésiculaires, est le nombre de miARNs qui sont transmis par les vésicules. En effet, il semble peu pertinent d'imaginer qu'une seule copie d'un miARN ait un effet régulateur quelconque sur la physiologie de la cellule receveuse. L'étude de ce sujet est extrêmement délicate, car elle nécessite que l'on puisse quantifier de manière absolue le contenu en miARNs vésicule par vésicule, ce qui est actuellement techniquement impossible. Cependant, une étude a quantifié le nombre de miARNs par RT qPCR, et a rapporté la quantification au nombre d'exosomes présents dans l'échantillon (Chevillet et al., 2014). Cette étude démontre qu'il existe en moyenne moins d'une copie de miARNs par vésicule. Cette conclusion semble donc peu compatible avec les mécanismes de régulation décrits. Je propose plusieurs explications à cette contradiction. D'abord, les auteurs ont réalisé une courbe étalon à l'aide de miARNs synthétiques pour pouvoir quantifier les miARNs endogènes. Il se peut que les miARNs synthétiques soit techniquement plus facile à détecter que les miARNs endogènes, associés à d'autres molécules. Ainsi, leur quantification serait sous-estimée. D'autre part, notre travail, ainsi que les travaux qui décrivent un mécanisme de régulation ont principalement été réalisés *in vitro*, et ajoutent une grande quantité de vésicules sur les cellules receveuses (Ekström et al., 2012; Montecalvo et al., 2012; Sruthi et al., 2017). Il se peut donc que les paramètres expérimentaux ne reproduisent pas les conditions physiologiques, et que la régulation observée ne soit qu'un artefact expérimental. Une autre hypothèse est que le travail de Chevillet et de ses collaborateurs ne représente pas les conditions physiologiques. En effet, les vésicules sont purifiées à partir de plasma humain, ou de milieu de culture de lignées cellulaires. En d'autres termes, les vésicules sont purifiées à partir d'un contexte biologique global. Or, il est fort probable que la communication inter-cellulaire par échange de vésicules se réalise localement entre deux cellules voisines, et que le message

moléculaire local soit donc masqué et dilué avec la méthode de purification globale. Une quatrième hypothèse est que la méthode de purification des EVs par ultracentrifugation endommage la membrane des vésicules, libérant le contenu de ces dernières dans le milieu extra-cellulaire, favorisant ainsi leur dégradation. L'étude stoechiométrique du nombre d'EVs et du nombre de miARNs par EVs doit donc être complétée.

La problématique précédente amène aussi à la question de la localisation des miARNs par rapport aux EVs : les miARNs sont-ils contenus dans la lumière des EVs, ou sont-ils transportés à la surface des EVs ? Plusieurs travaux qui s'intéressent à l'échange des miARNs vésiculaires réalisent des digestions à la RNase pour dégrader les miARNs libres, et concluent que les miARNs sont empaquetés à l'intérieur des EVs (Cheng et al., 2014; Shurtleff et al., 2016). Néanmoins ce contrôle ne suffit pas à exclure un transport à la membrane des EVs de miARNs protégés par des protéines, comme par exemple le complexe RISC. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une série d'expérimentations, dans lesquelles nous avons réalisé soit **1)** une digestion à la RNase seule, ou **2)** ou digestion à la protéinase K suivie d'une digestion à la RNase, suivie d'une RT qPCR. Cette stratégie n'a pas permis d'exclure une localisation extra-vésiculaire des EVs des miARNs, en revanche nous pouvons affirmer qu'une partie des miARNs est empaquetée dans la lumière des EVs. Pour répondre complètement à cette question, il serait intéressant de visualiser les molécules de miARNs dans les EVs. Cela nécessite de développer un protocole de marquage des miARNs qui soit compatible avec de la microscopie électronique.

3.4. Mécanisme d'empaquetage sélectif des miARNs dans les neurones.

Nos résultats suggèrent un empaquetage sélectif de certains miARNs dans les EVs en réponse à une forte activité neuronale. Des résultats en faveur d'un empaquetage sélectif ont déjà été publiés (Koppers-Lalic et al., 2014; Mittelbrunn et al., 2011; Nolte-'t Hoen et al., 2012; Villarroya-Beltri et al., 2013), en revanche c'est la première fois, à notre connaissance, qu'il est montré que la sélection des miARNs cargos peut être dépendante de l'activité neuronale.

Plusieurs études mettent en évidence la présence de motifs enrichis dans les miARNs empaquetés dans les EVs, nommés EXOmotifs, qui serviraient à la sélection d'adressage dans les EVs (Hoshina et al., 2016; Villarroya-Beltri et al., 2013). D'autres études montrent l'implication de protéines de la famille des *RNA-binding protein* comme Y-

box1 ou SYNCRIP (Santangelo et al., 2016; Shurtleff et al., 2016). Enfin, une équipe montre que la voie de signalisation KRAS-MEK participe à la localisation sélective de la protéine AGO2 dans les exosomes (Cha et al., 2015; McKenzie et al., 2016). Nous avons cherché à retrouver les motifs présentés dans les études précédentes, dans les miARNs que nous retrouvons spécifiquement exprimés dans les EVs comparé aux cellules. Nous n'avons pas retrouvé les EXOmotifs identifiés dans l'étude de Villarroya-Beltri et Shurtleff. De plus, nous n'avons pas cherché à révéler la présence de la protéine hnRNPA2B1, qui interagit avec l'EXOmotif présenté par Villarroya-Beltri, car ce travail a déjà été réalisé par Charlotte Javalet au cours de sa thèse, sur des exosomes issus de cultures primaires de neurones (même modèle d'étude que le nôtre), et ne l'a pas retrouvée (Charlotte Javalet, 2016). Nous pensons donc que les EXOmotifs et les acteurs responsables de l'adressage spécifique de certains miARNs dans les EVs sont dépendants de la nature de la cellule d'intérêt. Nous avons donc cherché à identifier des EXOmotifs *de novo* pour les EVs du SNC. Malheureusement, nous n'avons pas pu identifier de nouveaux EXOmotifs. Ce résultat s'explique peut-être par le nombre peu important de miARNs que nous avons identifié dans les EVs par RT-qPCR. Une analyse de ces vésicules par NGS nous permettrait peut-être d'identifier un motif spécifique des cellules du SNC.

3.5. Le transfert de miARNs dans les EVs : un nouveau mécanisme de régulation de la plasticité neuronale ?

Nos résultats de corrélation bioinformatique montrent une corrélation entre l'expression des miARNs issus des EVs de cultures activées, et celle de gènes dans les cellules receveuses intervenant dans la régulation de la plasticité neuronale. Cela suggère pour la première fois que l'échange de miARNs vésiculaires jouerait un rôle dans la régulation de la plasticité neuronale.

Pour confirmer cette hypothèse, nous envisageons de valider les prédictions bioinformatiques que nous avons obtenues, afin de confirmer que les miARNs d'intérêt régulent effectivement leurs cibles prédictives. Pour cela, nous avons développé des virus qui codent pour les miARNs d'intérêt suivants : miR-141, -295, -337 et -880, et le cel-miR-67 en contrôle, sous le contrôle du promoteur neuronal synapsine. Nous envisageons d'infecter des cultures primaires de neurones d'hippocampe, et de quantifier l'expression des miARNs et de leurs cibles prédictives par RT qPCR. Ensuite, nous souhaitons valider les résultats en effectuant des tests rapporteurs luciférase. L'ensemble de ces

expérimentations nous permettra de valider la régulation des miARNs sur les ARNm cibles que nous avons prédits.

Dans un second temps, nous souhaitons démontrer expérimentalement le transfert des miARNs entre les EVs et les cellules receveuses, ainsi que leur pouvoir régulateur. Nous avons réalisé un premier test entre des EVs issues de la lignée cellulaire HEK 293 transfectée avec le cel-miR-67, un miARN exogène originaire du nématode *c. elegans*, et des cultures primaires de neurones électroporées avec la construction rapportrice du cel-miR-67. Ces résultats confirment que les miARNs vésiculaires sont libérés dans les cellules receveuses, et sont capables d'y réguler leurs cibles (Figure 29). Nous souhaitons réitérer cette expérience dans laquelle des cultures primaires de neurones seront la source d'EVs, et serviront de cellules receveuses.

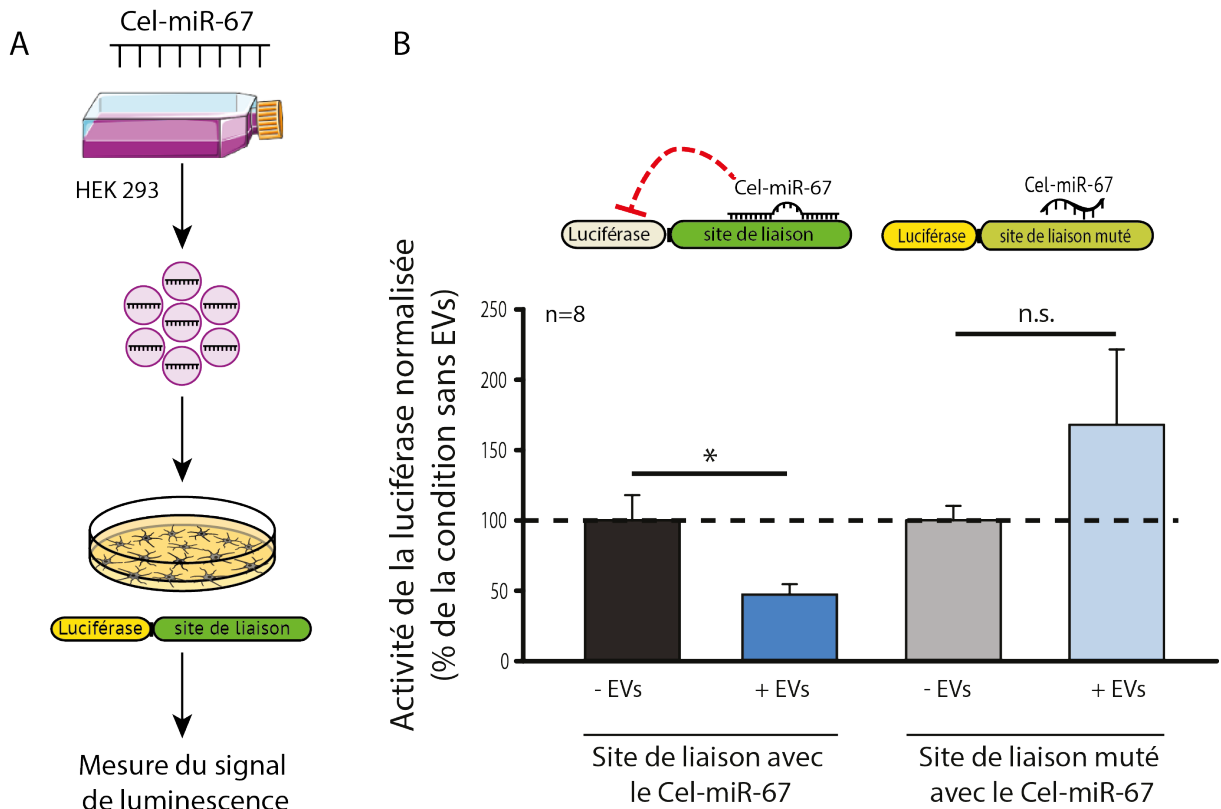


Figure 29: Test préliminaire de transfert des miARNs vésiculaires vers les cellules receveuses.

A : Représentation du principe de l'expérience. Les cellules HEK 293 ont été transfectées avec le miARN exogène cel-miR-67, originaire de *c. elegans*. Les EVs ont été purifiées, puis ajoutées dans des cultures primaires d'hippocampe, électroporées avec la construction rapportrice luciférase fusionnée à soit 1) la partie 3'UTR contenant le site de liaison avec le cel-miR-67, soit 2) la partie 3'UTR possédant un site de liaison muté. L'émission de bioluminescence a été quantifiée 24h après l'ajout des EVs. **B : Résultats expérimentaux du test rapporteur luciférase.** Une diminution de l'émission de la bioluminescence est observée avec l'ajout d'EVs contenant le cel-miR-67, sur les cellules

exprimant la construction rapportrice avec le site de liaison, mais pas celles exprimant la construction avec le site de liaison muté.

Nous envisageons également de confirmer la régulation potentielle des EVs sur la physiologie des neurones. Pour cela, nous souhaitons évaluer la variation d'activité neuronale de cultures primaires incubées avec des EVs libérées par des cultures contrôles ou activées. Pour cela, nous pensons mettre en œuvre la méthode d'optopatch (Hochbaum et al., 2014) et de *multi electrode array* (Nicholson and Llinás, 1975), à l'aide du Dr Yves Le Feuvre, électrophysiologiste de l'équipe. Ces techniques nous permettront d'enregistrer la variation d'activité des neurones, à l'échelle du réseau, en fonction de la nature des EVs ajoutées à leur milieu de culture.

Pour conclure, ce travail renforce l'hypothèse d'un rôle régulateur joué par l'échange de miARNs vésiculaires dans le SNC. Nos résultats suggèrent aussi que ce mode de communication peut être impliqué dans les mécanismes de régulation de la plasticité neuronale. Dans le but de mieux comprendre l'importance de cette voie de communication dans le SNC, il serait intéressant d'évaluer le rôle individuel de chacun des types cellulaires : les neurones et les cellules gliales.

CHAPITRE 4

Mise au point d'une technique de purification des vésicules extracellulaires selon l'origine du type cellulaire.

Chapitre 4 : Mise au point d'une technique de purification des vésicules extracellulaires selon l'origine du type cellulaire.

1. Introduction.

Isoler, purifier et surtout séparer les différents types de vésicules extracellulaires est un véritable défi. En effet, les EVs sont de petite taille, il n'existe actuellement pas de marqueurs totalement discriminants entre les exosomes et les microvésicules, et la contamination des échantillons avec des débris cellulaires peut se réaliser. Ainsi, le développement de nouvelles technologies et méthodes de purification des EVs est un sujet d'actualité. Actuellement, il existe plusieurs stratégies, dont les principales vont être présentées ci-après.

1.1. Les principales techniques de purification des vésicules extracellulaires.

1.1. L'ultracentrifugation, la méthode phare.

La méthode la plus utilisée pour purifier les EVs se base sur des étapes de centrifugations différentielles et d'ultracentrifugation (Zaborowski et al., 2015). Cette technique sépare les vésicules extracellulaires des autres composants de l'échantillon selon leur capacité de sédimentation différentielle. Cette dernière dépend de la taille et de la densité des particules (Lane et al., 2017).

La technique d'ultracentrifugation a originellement été décrite par Clothile Théry (Théry et al., 2006), et est très utilisée pour purifier les exosomes. Cette méthode consiste en une étape initiale de centrifugation à faible vitesse pour éliminer les cellules (300 g, 10 min à 4°C) et les débris cellulaires (2000g, 10 min, 4°C). Dans la plupart des protocoles, cette étape s'ensuit d'une méthode de séparation des grandes et des petites vésicules (microvésicules et exosomes respectivement), par une filtration 0,2-0,8 µm ou une centrifugation à 10 000- 20 000g. Si l'étape précédente n'est pas réalisée, à la fois les exosomes et les microvésicules seront culotés. La phase suivante consiste à effectuer une ultracentrifugation pour culoter les vésicules (100 000g, 1,5 ou 2h). Finalement, des étapes supplémentaires peuvent être effectuées, selon la nature de l'échantillon de départ (milieu de culture ou fluide corporel de patient) pour affiner la purification ou la séparation des

catégories de vésicules. Par exemple, pour les échantillons visqueux provenant des fluides corporels, des étapes de dilutions incrémentielles dans du PBS suivies de nouvelles phases de centrifugation, ou bien l’ultracentrifugation dans un gradient de sucrose peuvent être réalisées (Rani et al., 2011). Les centrifugations dans un gradient de densité favorisent la purification des EVs, et la séparation des différentes sous-populations par leur taille (Heijnen et al., 1999; Théry et al., 2001).

Tableau 6: Présentation des protocoles généraux d’ultracentrifugation pour les exosomes et les microvésicules.

	Exosomes	Microvésicules
Taille	40-120 nm	100nm-1µm
Etapes de centrifugation et de filtration	1. 300g, 10 min 2. 2000g, 10 min 3. Filtration (0,1 ; 0,22 ou 0,8 µm) 4. 100000-120000g, 1,5-2 h	1. 300g, 10 min 2. 2000g, 10 min 3. Filtration (optionnel) 0,8, 1µm 4. 10-20 000g, 30 min
Purifications additionnelles	1. Dilutions multiples dans du PBS et centrifugations 100000g, 70 min 2. Centrifugation dans un gradient de sucrose 3. Immuno-affinité	Pas décrit
Fraction dans le gradient de sucrose	1,07-1,18 g/mL	1,12-1,20 g/mL

Tableau adapté de : (Zaborowski et al., 2015; Kowal et al., 2016).

Le protocole présenté ci-dessus est général (Tableau 6), et peut s’adapter à la nature de l’échantillon ou aux analyses subséquentes. Deux protocoles à base d’ultracentrifugation ont notamment été adaptés et mis au point pour étudier les EVs du SNC : le premier est adapté à la collecte des EVs à partir de milieu de cultures primaires de neurones (Laulagnier et al., 2017), alors que le second propose de récupérer les EVs à partir de tissu humain de SNC (Vella et al., 2017).

1.2. L’immuno-purification.

Les méthodes basées sur l’immuno-affinité sont également courantes. Le principe est de greffer à la surface de billes magnétiques des anticorps dirigés contre un marqueur protéique exprimé à la surface des EVs. Les EVs sont ensuite collectées du milieu à l’aide d’un aimant, qui fixe les billes. L’utilisation de billes magnétiques commerciales, couvertes d’anticorps dirigés contre les tétraspanines CD63, CD9 et CD81 qui sont exprimées à la surface des EVs a par exemple été effectuée (Kowal et al., 2016; Shurtleff et al., 2016).

D'autre part, l'immuno-affinité peut permettre de discriminer l'origine cellulaire des EVs d'intérêt, dans le cas où un marqueur spécifique du type cellulaire est connu pour être incorporé dans les EVs. Par exemple, des billes couvertes de l'anticorps dirigé contre A33 ont permis de purifier des EVs libérées par des cellules cancéreuses (Mathivanan et al., 2010). D'autre part, l'utilisation de billes couplées à l'anticorps contre Ep-CAM a enrichi la capture d'EVs libérées par des cellules de cancer ovarien à partir de sérum (Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Enfin, une équipe a mis en évidence que la protéine α -synucléine est retrouvée plus exprimée dans les exosomes issus de neurones de patients souffrant de la maladie de Parkinson, en purifiant les exosomes avec des billes couvertes de l'anticorps contre L1CAM (Shi et al., 2014), qui a précédemment était montrée comme étant exprimée à la surface des exosomes de neurones (Fauré et al., 2006).

1.3. La chromatographie à exclusion de taille.

La chromatographie à exclusion de taille est une méthode dans laquelle les molécules sont séparées selon leur taille (et pas leur poids moléculaire). Elle se réalise à l'aide de billes poreuses, regroupées dans des colonnes, et attachées sur un support neutre. Les billes sont criblées de nombreux pores de tailles variables (Mol et al., 2017).

La solution est éluée dans la colonne de la chromatographie à exclusion de taille, et les molécules traversent les pores. Il existe une corrélation entre le temps d'éluion, et la taille des molécules. En effet, plus la molécule est petite, plus facilement elle va pouvoir traverser les pores de petite taille. Cela signifie que les molécules de petites tailles pénètrent profondément dans la matrice de billes, elles sont donc retenues longtemps dans la colonne. Au contraire, plus la molécule est grande, moins elle sera retenue dans les billes car elle les traverse par les gros pores. Ainsi les molécules de grandes tailles sont éluées rapidement (Lane et al., 2017; Taylor and Shah, 2015).

1.4. Les solutions de précipitation commerciales.

L'intérêt grandissant envers l'étude des EVs, ainsi que la lourdeur de la méthode de purification principale par ultracentrifugation, ont provoqué le développement de solutions de purification « clé en main », faciles d'utilisation. Le principe général est le suivant : les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation, puis le milieu est incubé avec la solution de précipitation. Ensuite, les EVs sont précipitées par centrifugation douce en comparaison avec l'étape d'ultracentrifugation classique décrite précédemment. Néanmoins, les

mécanismes précis d'action de ces solutions restent le secret des fournisseurs (Lane et al., 2017).

Aujourd'hui, beaucoup de fournisseurs des laboratoires de recherche proposent une solution de précipitation des EVs, dont voici quelques exemples (Lane et al., 2017) :

- ExoQuick, SBI, adapté pour le milieu de culture, et les fluides biologiques.
- Total Exosome Isolation Reagent, Invitrogen, destiné à être utilisé pour le milieu de culture ou le sérum.
- ExoSpin, Cell Guidance Systems, adapté pour le milieu de culture de cellules, les échantillons d'urine, de salive, de sang et de plasma ;
- ExoEasy, Qiagen, adapté pour le milieu de culture de cellules, le plasma et le sérum.

1.5. Quelques points de comparaison des différentes méthodes de purification.

Tableau 7: Comparaison des méthodes de purification des EVs.

	Avantages	Désavantages
Ultracentrifugation	Méthode de référence pour purifier les exosomes, purification propre, possibilité d'ajouter d'autres étapes de purification. Permet de partir d'échantillons de gros volumes.	Méthode longue, peu de discrimination des sous-types de vésicules, et de l'origine cellulaire, parfois perte de la fonction biologique des EVs purifiées. Nécessite du matériel adapté (ultracentrifugeuse, rotor, tubes)
Immunopurification	Rapide et efficace, peut permettre dans certains cas de discriminer l'origine cellulaire	Pas de discrimination des sous-types de vésicules, coûteux en anticorps, liaison aspécifique
Chromatographie à exclusion de taille	Évite la co-purification d'agrégats de protéines ou de lipoprotéines, rapide, très efficace à partir de fluides corporels	Pas de distinction de l'origine cellulaire des EVs
Solutions de précipitation	Facile à mettre en oeuvre, peu de matériel de départ	Onéreux, co-purification de contaminants, pas de distinction entre les exosomes et les microvésicules, peu adapté pour les méthodes d'analyses protéiques et nucléiques.

Sources : (Böing et al., 2014; Greening et al., 2015; Lane et al., 2017).

Ces différentes méthodes ont été comparées (Böing et al., 2014; Greening et al., 2015; Zaborowski et al., 2015; Zarovni et al., 2015), et chacune présente des avantages et des inconvénients (Tableau 7). Plus concrètement, bien que l'ultracentrifugation soit la méthode la plus utilisée, présentée comme la méthode standard de purification des EVs, les techniques d'immuno-affinité et de chromatographie à exclusion de taille semblent plus

performantes et co-purifient moins de contaminants à partir d'échantillons complexes comme les fluides corporels (Böing et al., 2014; Greening et al., 2015). Au contraire, bien que les solutions de précipitations commerciales soient rapides et très faciles à mettre en œuvre, elles présentent peu de spécificité, ne permettent pas de distinguer les petites des grandes vésicules, et surtout co-purifient les agrégats de protéines et les complexes de lipoprotéines (Lobb et al., 2015).

D'autre part, la méthode de purification des EVs impacte la qualité des analyses qui suivent, en particulier pour les analyses transcriptomiques et protéomiques (Taylor and Shah, 2015). Par exemple, l'ultracentrifugation peut endommager les membranes des vésicules, ce qui peut réduire la récupération des protéines et des ARNs, et par conséquent en limiter l'analyse (Taylor and Shah, 2015).

Dans tous les cas, mis à part quelques immuno-purifications particulières, il n'existe actuellement pas, à ma connaissance, de méthode qui permette de discriminer l'origine cellulaire des EVs.

1.2. L'intérêt d'une purification cellule spécifique des vésicules extracellulaires dans le système nerveux.

La vision de la synapse chimique classique, qui consiste en la communication des éléments pré- et post-synaptiques, s'est récemment transformée, et inclut plus activement les cellules gliales, en particulier les astrocytes et les microglies.

1.2.1. La synapse tri-partite : le neurone pré-synaptique, post-synaptique, et l'astrocyte.

L'analyse de l'ultrastructure du SNC montre que les astrocytes entourent et enroulent les terminaisons nerveuses, ce qui fait d'eux un intermédiaire de communication privilégié avec les synapses (Araque et al., 1999a). D'autre part, les astrocytes présentent à leur surface plusieurs récepteurs aux neurotransmetteurs, et l'activation de ces récepteurs conduit à la création d'une vague calcique chez les astrocytes, suivie de la libération de glutamate dans la fente synaptique (Bezzi et al., 1998; Parpura et al., 1994; Pasti et al., 1997). La libération d'autres molécules actives, comme l'ATP, ou encore la D-sérine, ont été également décrites (Bezzi and Volterra, 2001). En retour, les gliotransmetteurs agissent sur les neurones avec un décours temporel qui s'étend de la seconde à la minute, et régulent la transmission synaptique (Araque et al., 2014). Ces découvertes ont établi le concept de la

synapse tripartite, qui regroupe les éléments neuronaux pré- et post-synaptiques, ainsi qu'un astrocyte. La synapse tripartite représente une vision fonctionnelle intégrative de la physiologie de la synapse, dans laquelle l'astrocyte est considéré comme un protagoniste actif dans la régulation du transfert d'information entre les neurones (Araque et al., 1999b) (Figure 30).

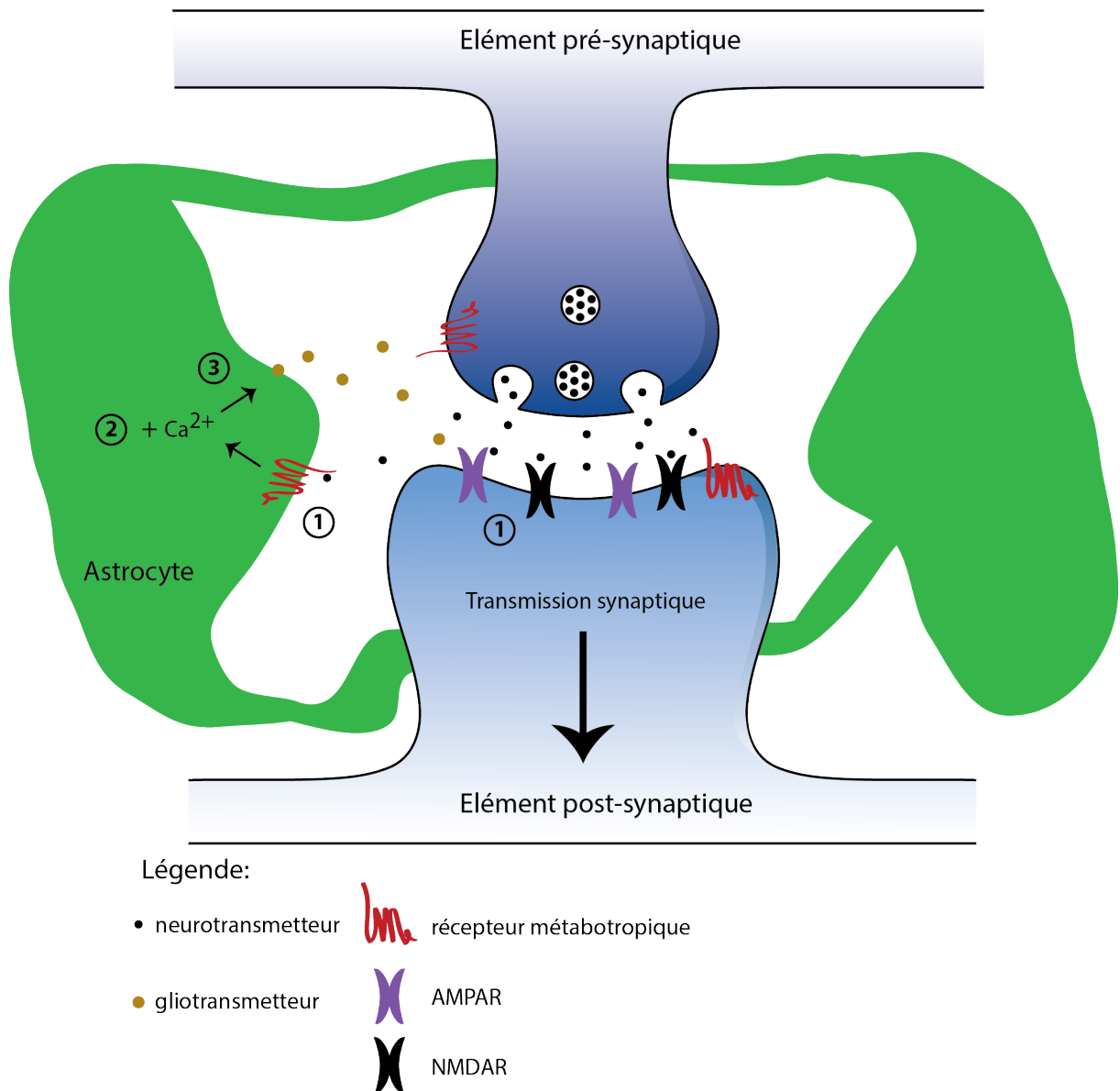


Figure 30: Représentation de la synapse tripartite.

Le concept de la synapse tripartite considère l'astrocyte (en vert) comme étant fonctionnellement intégré dans les composants de la synapse. Durant la transmission synaptique, le glutamate (neurotransmetteur excitateur) est libéré dans la fente synaptique. Ce dernier active les récepteurs NMDA et AMPA situés à la surface de l'élément post-synaptique, ainsi que les récepteurs métabotropiques qui se situent à la surface de l'astrocyte (1). Cela entraîne une élévation de la concentration intracellulaire en calcium dans l'astrocyte (2). En retour, l'astrocyte libère des

gliotransmetteurs dans la fente synaptique (3), qui vont réguler l'efficacité de transmission. Ce schéma est largement inspiré de : (Panatier et al., 2014).

1.2.2. L'hypothèse de la synapse quadri-partite : les neurones pré-synaptique, post-synaptique, l'astrocyte, et la microglie.

Les microglies, qui sont les cellules immunitaires résidentes du SNC, sont dynamiques en condition physiologique et surveillent constamment l'environnement en étendant et rétractant leur prolongements (Schafer et al., 2013). Plus précisément, les prolongements des microglies entrent en contact physique avec les astrocytes et les neurones (Nimmerjahn et al., 2005). D'autre part, plusieurs travaux montrent que les microglies peuvent rapidement modifier la dynamique de leurs prolongements, mais également leur libération de cytokine et leur potentiel de membrane, en réponse à la neurotransmission (Biber et al., 2007; Kettenmann et al., 2011). En effet, les microglies sont équipées de récepteurs aux neurotransmetteurs (Pocock and Kettenmann, 2007), suggérant leur capacité à déceler la modification de l'activité synaptique. D'autre part, les microglies modulent les transmissions synaptiques excitatrices et inhibitrices (Pascual et al., 2012; Tsuda et al., 2003), en libérant divers types de molécules, comme des chémokines et des chimiokines, ou des neurotransmetteurs (Rial et al., 2015). Tous ces arguments sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les microglies jouent aussi un rôle critique dans la régulation de l'efficacité de la transmission synaptique (Rial et al., 2015), dans le concept de la synapse quadripartite (Schafer et al., 2013) (Figure 31).

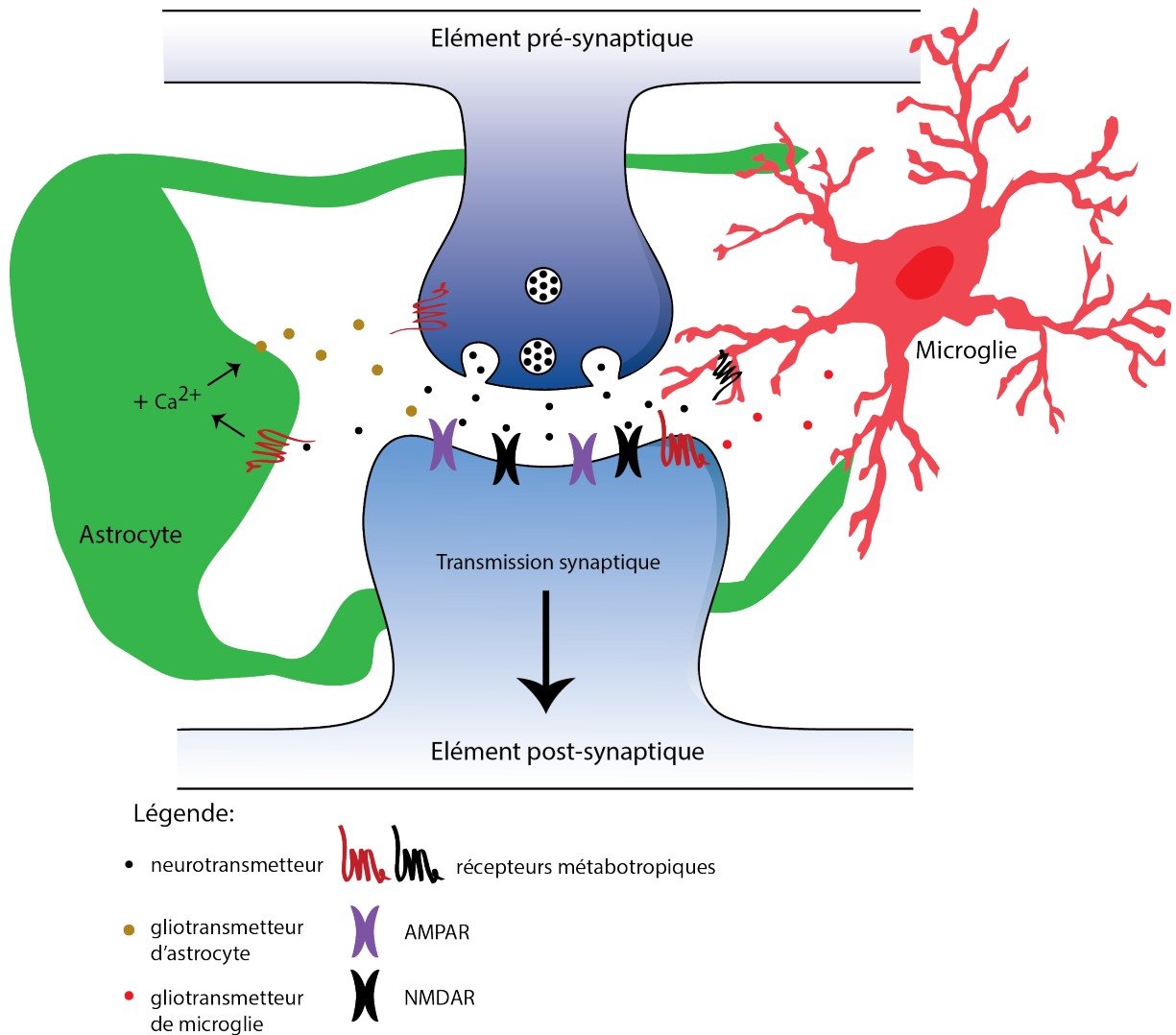


Figure 31: Représentation de la synapse quadripartite.

La synapse quadripartite se compose des éléments neuronaux pré- et post-synaptiques (bleu), d'un astrocyte (vert), et de la microglie (rouge). Les microglies sont dotées de récepteurs aux neurotransmetteurs neuronaux, qui leur permettent de détecter les variations d'activité synaptique. En réponse, elles libèrent des gliotransmetteurs, qui modulent la transmission synaptique, et d'autres molécules. Schéma inspiré de : (Rial et al., 2015).

1.3. La problématique de l'étude.

Les vésicules extracellulaires sont libérées par tous les types cellulaires du SNC, et jouent un rôle crucial dans la communication inter-cellulaire. Les premiers travaux démontrent que l'échange de vésicules extracellulaires intervient dans la modulation de divers processus, importants pour la physiologie du SNC : la transmission synaptique, la myélinisation, l'inflammation, la protection des neurones, ou encore l'arborisation dendritique. Ainsi, l'échange de telles vésicules pourrait également participer à la

régulation de la transmission synaptique dans les concepts des synapses tri- et quadri-partites.

Cependant, les démonstrations du rôle des vésicules extracellulaires ont principalement été réalisées à partir de cultures primaires de cellules enrichies en un type cellulaire particulier. Ce modèle présente une limite importante : la séparation physique des différents types cellulaires entre eux. Cela crée un modèle d'étude peu représentatif de la physiologie réelle du SNC, dans laquelle les cellules sont imbriquées entre elles, et leurs fonctions inter-dépendantes.

D'autre part, les techniques actuelles de purification des vésicules extracellulaires ne permettent pas d'isoler les vésicules selon leur origine cellulaire. De plus, la littérature actuelle ne décrit pas la présence de marqueur de surface exprimé sur les vésicules qui soit spécifique des neurones, des astrocytes, et des microglies. Ces restrictions limitent les études ayant pour but d'élucider le rôle des vésicules extracellulaires libérées par chacun des types cellulaires du SNC.

L'objectif de ce travail est de mettre en place une stratégie de purification des vésicules extracellulaires, en tenant compte de leur origine cellulaire.

Dans ce travail, j'ai participé à l'élaboration des stratégies expérimentales, à leur réalisation, et à l'analyse des résultats. J'ai également réalisé les figures associées.

2. Matériel et méthodes.

2.1. Stratégie de clonage.

Les séquences des gènes (CD63 et Lamp2b), et promoteurs (synapsine, GFAP, CX3CR1) à amplifier ont été récupérées sur la plateforme Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Les amorces de PCR ont été réalisées sur Perlprimer, en tenant compte des paramètres suivants :

- Longueur des amorces comprises entre 18 et 25 nt
- Température d'hybridation comprise entre 50 et 65 °C
- Moins de 2 °C d'écart pour la température d'hybridation entre les deux amorces.

Les séquences des sites reconnus par les enzymes de restriction d'intérêt ont été rajoutées dans les séquences d'amorces, et la température d'hybridation a été recalculée avec l'outil Tm calculator de Thermo Fisher Scientific.

Les amplifications par PCR ont été réalisées à partir d'ADNc de l'organisme d'intérêt, en suivant les instructions du kit de l'enzyme ADN polymérase Phusion High-Fidelity, Thermo Fisher Scientific, dans le thermocycleur Mastercycler egradient, Eppendorf.

La taille des amplifiats de PCR a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1%, en utilisant l'intercalant d'ADN Sybr Safe, Thermo Fisher Scientific. Puis, les produits de PCR de la taille attendue ont été purifiés du gel, en suivant les instructions du kit GeneJet Gel extraction kit, Thermo Fisher Scientific. Une quantité d'1 µg d'insert et de vecteur (pcDNA3.1, Thermo Fisher Scientific) a été digérée par les enzymes de restrictions adéquates, à 37°C. Les inserts et les vecteurs ont été ligués entre eux en respectant un ratio compris entre 1/3 et 1/9 (vecteur/insert).

Les constructions liguées ont été insérées dans les bactéries ultracompétentes XL-10 gold, Stratagene, à l'aide d'un choc thermique de 30 sec à 42°C, en suivant les instructions du fournisseur et en condition stérile. Ensuite, les bactéries ont étéensemencées sur des boîtes d'agar contenant l'antibiotique adéquat, et mises en culture sur la nuit à 37°C. Le

lendemain, 10 colonies isolées ont été mises en cultures dans de l'agar liquide contenant l'antibiotique voulu (100µg/mL), à 37°C, sur la nuit et sous agitation.

Les plasmides ont été isolés des bactéries en suivant les instructions du fournisseur du kit GeneJET Plasmid Miniprep, Thermo Fisher Scientific. La vérification de l'incorporation des inserts s'est réalisée par digestion du plasmide avec les enzymes de restriction utilisées, migration sur gel d'agarose 1%, et envoi au séquençage (Eurofins) des plasmides ayant incorporé un insert de la taille attendue.

Le séquençage a été vérifié par alignement de la séquence lue avec notre séquence théorique, à l'aide du logiciel BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Enfin, les plasmides dont la séquence a été validée ont été amplifiés et purifiés en suivant les instructions du kit Endofree Plasmid Maxi kit, Qiagen.

2.2. Création des virus.

Les constructions plasmidiques, contenant un promoteur spécifique (synapsine/GFAP ou CX3CR1), et la protéine Lamp2b taggée (HA, FLAG ou c-myc), ont été réalisées de nouveau dans un vecteur contenant les séquence de reconnaissance par les virus. Puis, les lentivirus déficients pour la répllication ont été réalisés par la plateforme de vectorologie Vect'UB (<http://www.tbmcore.u-bordeaux.fr/vectorologie/>).

2.3. Cultures cellulaires.

2.3.1. La lignée HEK 293.

Les cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) ont été mises en culture à 400 000/ flasque, dans des flasques de 25 cm² (Dutcher), avec du milieu de culture composé de : DMEM, glutamax 3,87mM, glucose 25 mM, pénicilline 100UI/mL, streptomycine 100mg/mL, GIBCO. Elles ont été cultivées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂.

2.3.2. Les cultures primaires d'hippocampe de rat.

Les hippocampes ont été prélevés à partir d'embryons de rats Sprague-Dawley au stade E18. Une dissociation enzymatique de 15 min avec de la trypsine a été réalisée, suivie d'une dissociation mécanique à l'aide de 2 pipettes pasteur en verre avec des embouts de diamètre différents. Les cellules ont été ensemencées sur des supports pré-coatés avec de

la poly-L-Lysine (Sigma) à 1mg/mL. La densité d'ensemencement était de 200×10^3 cellules /mL pour la méthode « banker », et de 800×10^3 / puits de plaques 6 puits pour les cultures mixtes. Les cellules ont été cultivées dans du milieu Neurobasal, Gibco, supplémenté de 2% de SM1, Stemcells Technologies, de 2 mM de L-glutamine, Gibco, et 8 uM d'AraC (cytosine- β -d-arabinofuranoside), Sigma, dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

2.4. Immunocytochimie.

Les cellules ont été rincées 5 min avec du PBS préchauffé à 37°C, puis fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15 min à 37°C. Avant l'incubation des anticorps primaires, les cellules ont été perméabilisées avec du PBS, 0,25% de Tween-20 pendant 30 min. L'incubation des anticorps primaires (Tableau 8) s'est réalisée à température ambiante 2h, dans une solution d'incubation composée de PBS, 0,25% Tween-20, 1% de BSA (Sigma). Les anticorps secondaires ont été incubés dans la même solution d'incubation, 2h à température ambiante. Les cellules ont été montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Dako. Les observations ont été réalisées avec le microscope à fluorescence (Axioplan 2 imaging, Zeiss), et les images ont été prises avec le logiciel NIS-Elements BR4.00.05.

Tableau 8: Anticorps utilisés pour l'immunocytochimie.

Cible de l'anticorps I	Espèce	Dilution	Fournisseur
GFP	lapin	1/500	Invitrogen
CD63	souris	1/500	BD Pharmingen
Lamp2	lapin	1/500	Thermo Fisher Scientific
HA	souris	1/1000	Covance
c-myc	souris	1/1000	Roche
Flag	lapin	1/1000	Abcam
Cible de l'anticorps II	Révélation	Dilution	Fournisseur
Souris	Alexa 568	1/1000	Invitrogen
Lapin	Alexa 488	1/1000	Invitrogen
Biotine	Alexa 568 et 488	1/1000	Invitrogen

2.5. Insertion des plasmides dans les cellules.

2.5.1. Lipofection dans la lignée HEK 293.

Les cellules HEK 293 ont été transfectées à 80% de confluence, en suivant les instructions du kit Effectene Transfection Reagent, Qiagen. Une quantité de 3 μ g totale de plasmide a été transfectée par flasque.

2.5.2. Electroporation dans les cultures primaires d'hippocampe.

Une quantité totale d'1 µg de plasmide pour 1 million de cellules fraîchement disséquées a été électroporée, en suivant les instructions du fournisseur (Amaxa Nucleofector for primary cells, Lonza). Le choc électrique a été réalisé en utilisant le programme CU-133, optimisé pour conserver une haute viabilité cellulaire.

2.5.3. Infection des cultures primaires d'hippocampe.

Les infections virales se sont réalisées dans une pièce de culture dédiée de niveau II, qui contient une entrée à double sas, et sous un PSM. Les cultures primaires ont été infectées 7 jours après leur mise en culture, à MOI 10 (*multiplicity of infection*), pendant 24h. Le lendemain, le milieu de culture a été entièrement renouvelé. Puis, chaque jour suivant, pendant 1 semaine, 1/3 du milieu de culture a été renouvelé.

2.6. Western blot.

Les cellules ont été rincées au PBS préchauffé à 37°C, puis 500 µL de milieu d'extraction protéique a été ajouté (HEPES pH: 7,2 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,1%, Igepal 1%, N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'éthylcarbodiimide hydrochloride 0,5%). Puis l'ensemble a été incubé 15 min sur de la glace, et finalement centrifugés 15 min à 8 000 g. Le surnageant a été récupéré, et dosé sur le Biophotomètre d'Eppendorf, en suivant les instructions du kit Protein Assay, Biorad. Ensuite, 10 µg de protéines a été dilué dans du tampon Laemli 6X, et dénaturé 10 min à 95 °C, puis mis 10 min dans la glace. Les protéines ont été déposées sur des gels commerciaux 4-20% d'acrylamide Mini-Protean TGX Stain-Free Precast gel, Biorad. La migration s'est réalisée dans le système MiniPROTEAN 3 Cell System, Biorad, 1h à 150 mV, avec un générateur PowerPac Basic, Biorad. Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène fluoride), Immobilon-P, pendant 1h à 100mV. La membrane a été saturée 1h dans du TBS, 0,1% de Tween-20 et 5% de lait. Les anticorps primaires (Tableau 9) ont été incubés sur la nuit à 4°C dans une solution de TBS, 0,1% de Tween-20, 2,5% de lait, et les anticorps secondaires 1h à température ambiante. La révélation s'est effectuée en suivant les instructions du kit SuperSignal Fast Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific, sur l'appareil Chemidoc XRS + System, Biorad. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Image lab, Biorad.

Tableau 9: Anticorps utilisés pour le Western blot.

Cible de l'anticorps I	Espèce	Dilution	Fournisseur
HA	souris	1/5000	Covance
c-myc	souris	1/5000	Roche
FLAG	lapin	1/5000	Abcam
Cible de l'anticorps II	Révélation	Dilution	Fournisseur
Anti-souris	HRP	1/10000	GeneTex
Anti-lapin	HRP	1/10000	GeneTex
Anti-Biotine	HRP	1/1000	Dako

2.7. RT qPCR.

Les cellules HEK 293 ont été transfectées soit avec le cel-miR-67, soit avec le cel-miR-39. Les ARNs ont été extraits en suivant les instructions du kit MiRNeasy Mini kit, Qiagen. Une quantité de 5 fmole par échantillon de spike-in du cel-miR-54 a été ajoutée dans le TriZol, Qiagen, avant l'extraction. Les ARNs ont été quantifiés sur le Nanophotomètre Pearl, Implen. Une quantité de 1 µg d'ARN a été reverse transcrite en suivant les instructions du fournisseur Ncode VILO miRNA cDNA Synthesis kit, Invitrogen. Puis, la qPCR s'est réalisée avec 5 ng d'ADN par puits, en suivant les instructions du fournisseur : Tli Rnase H Plus, Bulk, Takara, Clontech. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 95°C pendant 5s, puis 35 cycles de 95°C pendant 10 s, 60°C pendant 20s, et 72°C pendant 20s. Une courbe de dissociation a été réalisée à la fin, pour vérifier la spécificité de l'amplification. L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée en utilisant la méthode comparative $2^{-(\Delta\Delta C_p)}$ (Schmittgen and Livak, 2008). L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 5, en utilisant un test de Student. Le seuil de significativité utilisé est $p\text{-value} < 0,05$.

2.9. Immunopurification.

Les milieux de culture des cellules ont été centrifugés 5 min à 3000 g, puis le surnageant a été récupéré. Cette étape permet d'éliminer les débris cellulaires. Ensuite, l'étape d'immunopurification a été réalisée en suivant les instructions des fournisseurs :

- Anti-Flag M2 Magnetic Beads, Sigma ;
- Pierce Anti-HA Magnetic Beads, Thermo Fisher Scientific ;
- Pierce Anti-c-myc Magnetic Beads, Thermo Fisher Scientific.

3. Résultats.

La stratégie que nous avons imaginée est la suivante : créer une protéine de fusion, naturellement exprimée à la surface des EVs, marquée par une étiquette particulière, sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un type cellulaire (neurones versus cellules gliales). Les EVs sont ensuite purifiées par immunoprécipitation à l'aide de billes magnétiques couvertes d'anticorps dirigés contre l'étiquette d'intérêt (Figure 32).



Figure 32: Présentation de la stratégie de l'outil de purification des EVs selon l'origine cellulaire.

A : Représentation schématique des constructions plasmidiques d'expression des outils de purification des EVs selon l'origine cellulaire. Il existe 3 versions de la construction, chacune étant adaptée à un type cellulaire : neurones, astrocytes, et microglies, grâce à l'expression de promoteurs spécifiques, respectivement : synapsine, GFAP et CX3CR1. Nous avons choisi de faire exprimer sur la protéine une étiquette, différente pour chacun des types cellulaires. Finalement, les EVs sont purifiées du milieu de culture à l'aide de billes magnétiques couvertes d'anticorps dirigés contre un tag. **B :** Représentation schématique de l'outil de purification des EVs spécifiques d'un type cellulaire. L'étiquette se localise en position extravésiculaire pour permettre l'interaction avec les anticorps des billes magnétiques.

3.1. La stratégie n°1.

Dans un premier temps, nous avons choisi comme protéine de surface la tétraspanine CD63, qui est exprimée à la surface des EVs (Kowal, 2016). Nous avons inséré une étiquette spécifique (HA, Flag ou c-myc) dans la petite boucle de la tétraspanine, pour éviter de perturber les fonctions cellulaires de la protéine (Pols and Klumperman, 2009). Nous avons également ajouté la séquence codante pour la GFP dans le cadre de lecture de la protéine CD63 afin de visualiser notre protéine de fusion. Enfin, l'ensemble de

la construction s'exprime sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un type cellulaire d'intérêt : synapsine pour les neurones (Kügler et al., 2003), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) pour les astrocytes (Brenner et al., 1994), et CX3CR1 pour les microglies (Wolf et al., 2013) (Figure 33).

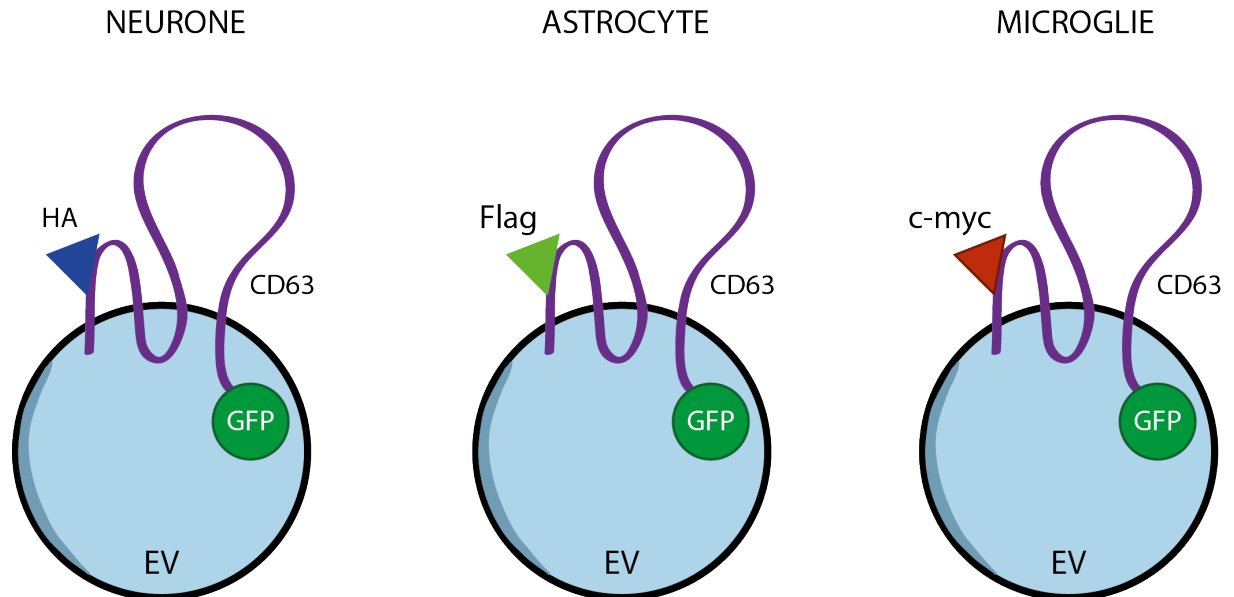


Figure 33: Version n°1 de l'outil de purification.

La protéine de surface est la tétraspanine CD63, composée d'une petite et d'une grande boucle extravésiculaire. Les étiquettes ont été placées sur la petite boucle : HA pour les neurones, Flag pour les astrocytes, et c-myc pour les microglies. Les promoteurs spécifiques sont synapsine pour les neurones, GFAP pour les astrocytes, et CX3CR1 pour les microglies. Une GFP a été placée en position intravésiculaire afin de repérer facilement la construction dans les cellules. Les EVs sont purifiées à l'aide de billes magnétiques couvertes d'anticorps dirigés contre : HA, Flag ou c-myc.

Nous avons testé nos constructions sur les cultures primaires d'hippocampe. Nous avons utilisé la méthode d'électroporation pour faire exprimer les plasmides. Nous avons révélé l'expression de la construction dans les neurones en réalisant une immunocytochimie contre la GFP (Figure 34). Nous révélons une expression pontilliforme dans les corps cellulaires et dans les prolongements, en adéquation avec la localisation des MVBs. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à révéler l'expression des tags par immunocytochimie. Notre hypothèse était que le tag était peu accessible sur la petite boucle par les anticorps à cause de l'encombrement structural de la grande boucle. Cette constatation n'étant pas compatible avec la stratégie d'immunopurification des EVs, nous avons décidé de placer un autre tag sur la grande boucle de la tétraspanine CD63.

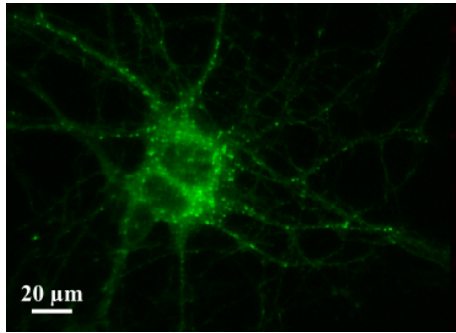


Figure 34: Immunocytochimie contre GFP.

La construction synapsine-CD63-HA-GFP a été électroporée dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Une immunocytochimie contre la GFP a été réalisée. Nous observons un marquage pontilliforme dans les corps cellulaires et les prolongements des neurones, correspondant à la répartition des MVBs.

3.2. La stratégie n°2.

Ainsi, la deuxième version de notre construction ressemble à la première. Nous avons ajouté un tag AP dans la grande boucle, et enlevé la GFP, car nous nous demandions si son encombrement, dû à sa taille imposante, ne parasitait pas notre construction (Figure 35). Le tag AP est biotinylé par l'enzyme BirA (Shu et al., 2013), que nous avons ajoutée dans le milieu de culture des cellules. Nous souhaitons bénéficier de la reconnaissance spécifique entre la biotine et la streptavidine, ainsi que de leur interaction forte, pour purifier par immunoprécipitation les EVs. Néanmoins, cette construction ne permet pas de récupérer les EVs des différentes cellules à partir d'un même échantillon. L'outil permet de purifier les EVs d'un type cellulaire par échantillon.

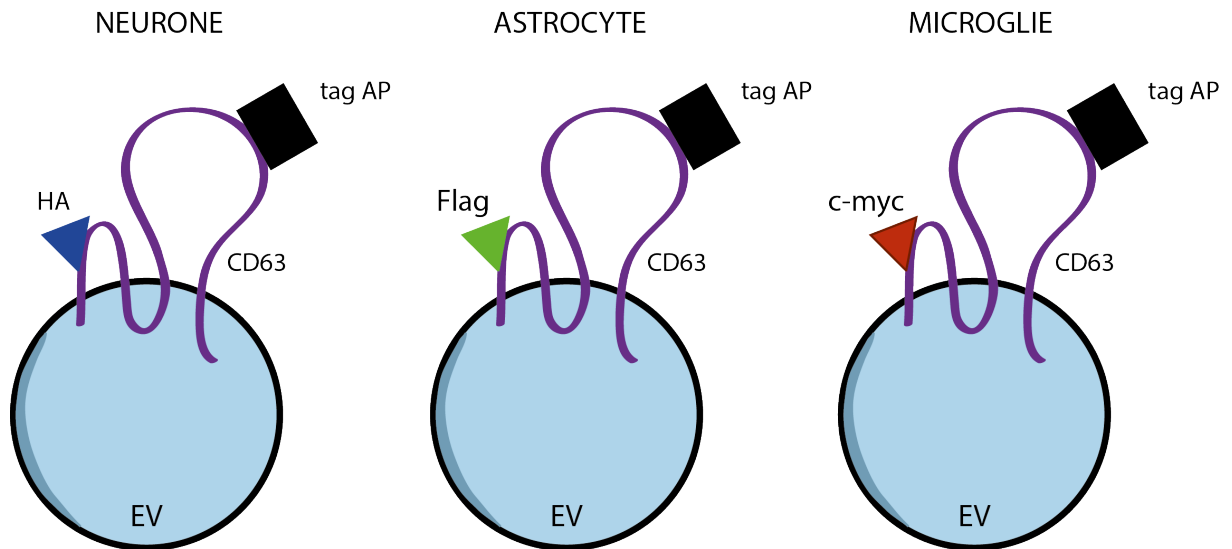


Figure 35: Version n°2.

La protéine de surface est la tétraspanine CD63. Un tag AP a été placé dans la grande boucle de la protéine. Ce tag est reconnu par l'enzyme BirA, qui y ajoute une biotine. Les promoteurs spécifiques sont synapsine pour les neurones, GFAP pour les astrocytes, et CX3CR1 pour les microglies. Les EVs sont purifiées par immunoprécipitation en utilisant des billes de streptavidine, qui reconnaissent spécifiquement la biotine.

Dans un premier temps, nous avons cherché à révéler l'expression de la biotine par Western blot à l'aide d'un anticorps couplé à la streptavidine. En contrôle, nous avons utilisé des constructions possédant le tag AP déjà validées. Nous avons réalisé les tests à la fois dans la lignée cellulaire HEK 293, et dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe. Nous avons révélé la présence de la biotine sur la construction contrôle, signifiant que l'enzyme BirA est fonctionnelle. En revanche, nous n'avons pas révélé la présence de la biotine sur la protéine de fusion que nous avons créée.

A cette période, Hung et Leonard ont publié un travail qui a permis, en partie, d'expliquer nos problèmes. Comme nous, ils ont cherché à faire exprimer sur une protéine de surface des EVs, Lamp2b, des étiquettes dans le but de les purifier par immunoprécipitation. Leur travail démontre que l'étiquette exprimée en position extraluminal est dégradée à cause du pH acide du MVB. Au contraire, l'étiquette exprimée en position intraluminal, protégée de l'acidité, reste intacte (Hung and Leonard, 2015). Nous avons pensé que leur travaux expliquaient nos difficultés à retrouver les étiquettes sur les protéines de fusion, qui sont exprimées en position extra-luminale, et donc sûrement dégradées à cause de l'acidité. De plus, de manière très intéressante, les auteurs arrivent à protéger leur étiquette extra-luminale de la dégradation, en ajoutant autour du

tag des séquences qui codent pour le peptide GNSTM, favorable aux glycosylations. Ils démontrent aussi que l'ajout des glycosylations autour du tag favorise l'efficacité de l'immunopurification des EVs (Hung and Leonard, 2015). Cette démonstration a donné naissance à la troisième version de notre construction.

3.3. La stratégie n°3.

Notre hypothèse était que nos étiquettes étaient dégradées par l'acidité du MVB. Ainsi, nous avons ajouté autour du tag AP des séquences qui codent pour le peptide GNSTM, dans le but de le protéger par des glycosylations (Figure 36). Une fois encore, nous n'avons pas réussi à montrer la présence de la biotine sur notre protéine de fusion, ni par immunocytochimie, ni pas Western-blot. Nous avons alors imaginé que les glycosylations bloquaient l'accès de l'enzyme BirA au tag AP, l'empêchant de greffer la biotine.

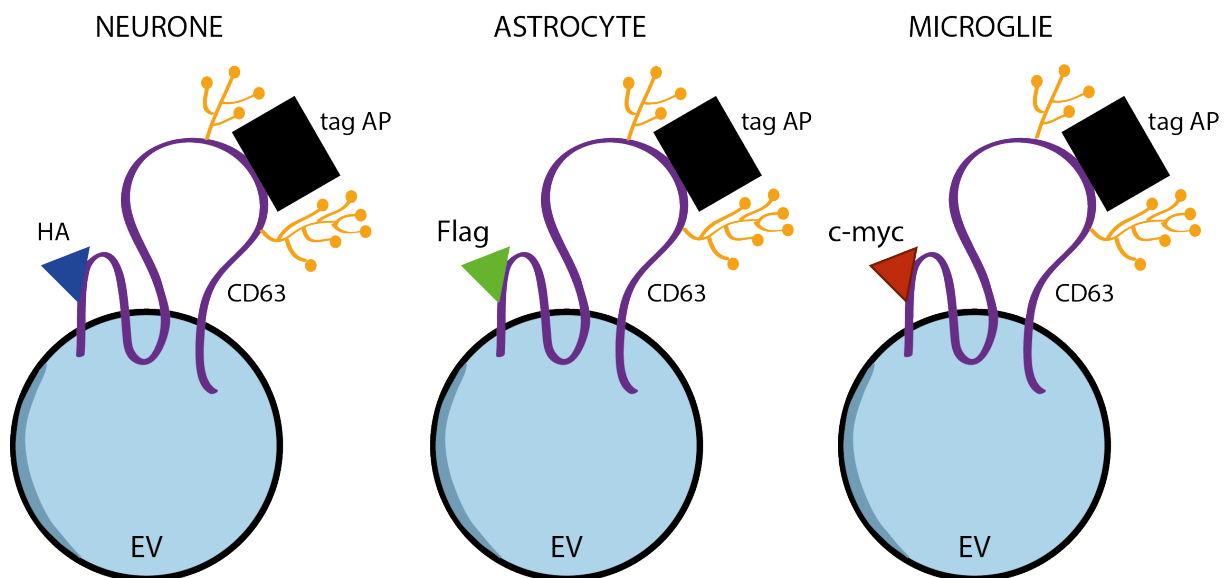


Figure 36: Version n°3.

La protéine de surface est la tétraspanine CD63. Un tag AP a été placé dans la grande boucle de la protéine, et protégé par des glycosylations, grâce à l'ajout de séquences autour du tag qui codent pour l'oligo GNSTM, fortement glycosylé. Les glycosylations sont représentées en orange. Le tag AP est reconnu par l'enzyme BirA, qui y ajoute une biotine. Les promoteurs spécifiques sont synapsine pour les neurones, GFAP pour les astrocytes, et CX3CR1 pour les microglies. Les EVs sont purifiées par immunoprécipitation en utilisant des billes de streptavidine, qui reconnaissent spécifiquement la biotine.

3.4. La stratégie n°4.

Suite à ces échecs successifs, nous avons décidé de repartir sur des bases solides et concrètes : la construction de Hung et Leonard, qu'ils nous ont envoyée. Ainsi, nous avons mis au point la version 4 de notre outil. Cette version exprime sur la protéine Lamp2b les différentes étiquettes initiales : HA, Flag et c-myc, protégées par des glycosylations, sous le contrôle des promoteurs spécifiques synapsine, GFAP et CX3CR1 (Figure 37). Ainsi, nous pensions nous préserver du manque d'accessibilité de l'enzyme BirA sur le tag AP.

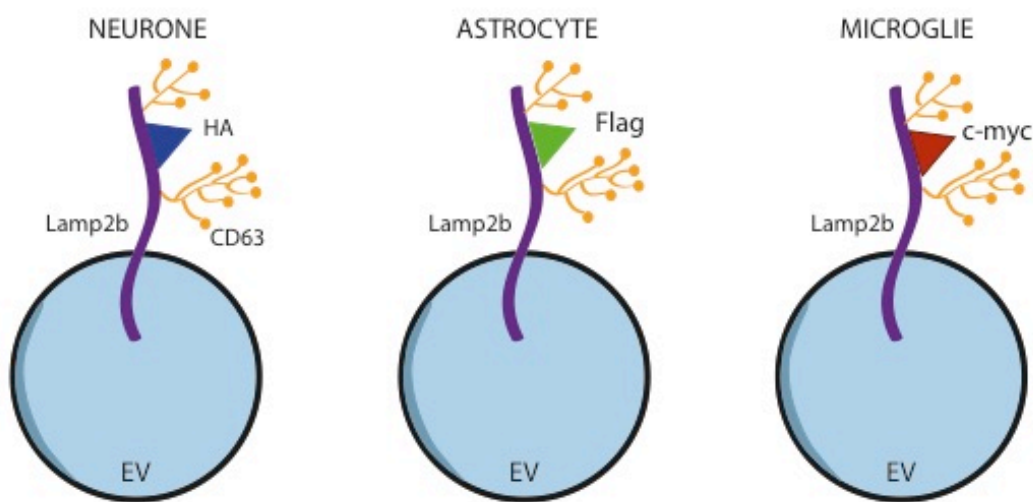


Figure 37: Version n°4.

La protéine de surface est Lamp2b. Un tag HA, Flag ou c-myc a été placé en position extraluminal, et est protégé par des glycosylations, grâce à l'ajout de séquences autour du tag qui codent pour l'oligo GNSTM, fortement glycosylé. Les glycosylations sont représentées en orange. Les promoteurs spécifiques sont synapsine pour les neurones, GFAP pour les astrocytes, et CX3CR1 pour les microglies. Les EVs sont purifiées par immunoprécipitation en utilisant des billes magnétiques couvertes d'anticorps dirigés soit contre HA, Flag ou c-myc.

Dans un premier temps, nous avons validé nos constructions en les exprimant (sans les promoteurs spécifiques) dans la lignée cellulaire HEK 293, et en contrôle nous avons transfecté un plasmide codant pour la GFP. Nous avons révélé par Western blot l'expression des protéines de fusion et des tags. La Figure 38 A montre l'exemple de la construction étiquetée avec HA. Nous pouvons voir que le marqueur HA n'est révélé que dans les cellules et les EVs issues des cellules transfectées avec le plasmide Lamp2b-HA.

Nous avons ensuite testé la spécificité des billes d'immunopurification. Pour cela, nous avons purifié les EVs à partir des milieux de cultures des cellules HEK 293, préalablement transfectées avec soit la construction Lamp2b-HA, soit la construction Lamp2b-c-myc. L'immunopurification a été réalisée à partir des milieux de cultures issus soit des cellules exprimant la construction Lamp2b-HA, soit la construction Lamp2b-c-myc, soit un mélange des deux milieux de culture. Chacune des billes d'immunopurification (anti-HA et anti-c-myc) a été utilisée dans toutes les combinaisons de milieux de cultures, et la présence des tags a été effectuée par Western blot. Pour plus de clareté, seule la révélation contre le HA est présentée (Figure 38 B). De manière très intéressante, nous pouvons voir que le tag HA n'est révélé que lorsque les billes couvertes des anticorps dirigés contre HA ont été mises en présence d'un milieu de culture contenant des EVs étiquetées HA. Les résultats sont similaires avec le tag c-myc. Ainsi, les résultats que nous avons obtenus étaient très prometteurs. Donc, nous en avons conclu que nos constructions expriment les tags dans la lignée HEK 293, et que le principe de la stratégie d'immunopurification spécifique fonctionne.

Dans un second temps, nous avons cherché à confirmer les résultats précédents dans les cultures primaires d'hippocampe, mais nous n'y sommes pas parvenus. Nous avons remis en cause notre méthode d'électroporation des cultures primaires, et avons pensé qu'elle n'était pas assez efficace pour que l'on puisse révéler la présence des tags. Ainsi, nous avons développé des lentivirus pour infecter les cultures avec nos constructions. Encore une fois, nos tests préliminaires n'ont pas confirmé la présence des tags dans les cultures primaires de neurones.

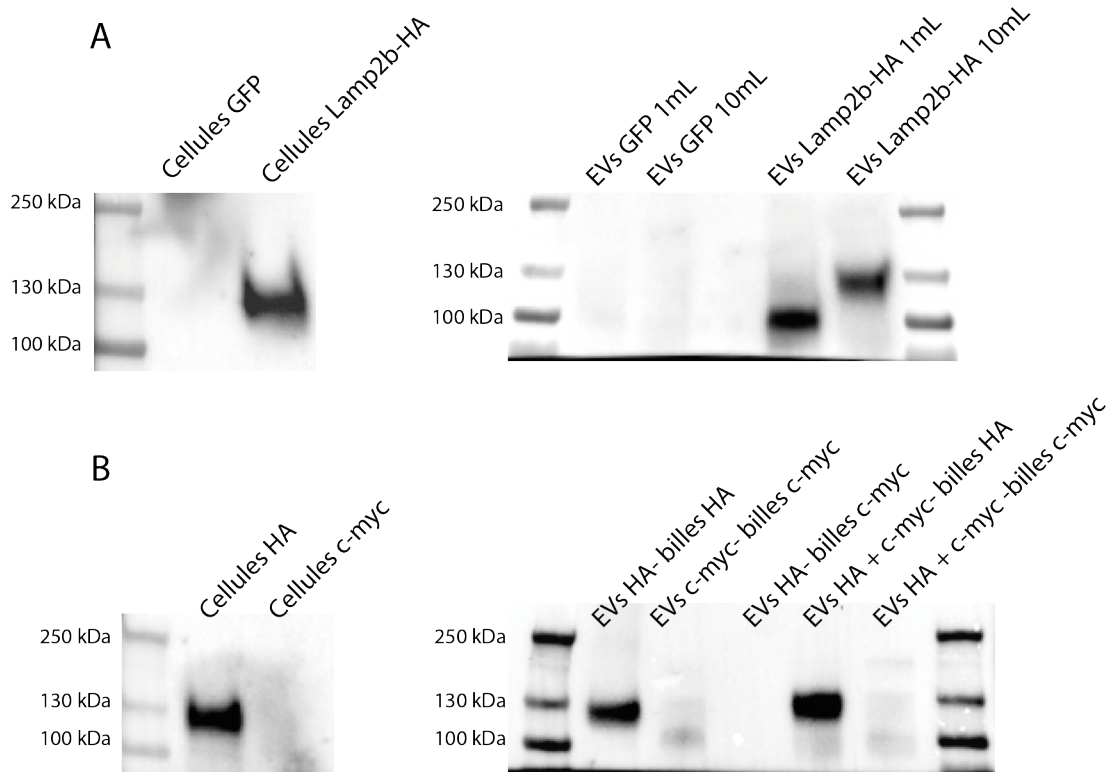


Figure 38: Résultats des premiers tests d'immunopurification sur les cellules HEK 293.

A : Révélation de l'expression de l'étiquette HA par Western blot. Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec soit un plasmide codant pour la GFP (contrôle), soit le plasmide codant pour la protéine Lamp2b-HA. La révélation de l'expression de l'étiquette HA s'est effectuée à partir de l'extrait protéique des cellules, ou bien à partir de 1 ou 10 mL de milieu de culture des cellules. Les résultats montrent une expression spécifique du tag HA dans les cellules transfectées avec la construction Lamp2b-HA et leurs vésicules extracellulaires. **B : Preuve de concept de la stratégie d'immunopurification des EVs, et révélation du tag HA.** Des cellules HEK 293 ont été transfectées soit avec le plasmide codant pour la protéine de fusion Lamp2b-HA ou Lamp2b-c-myc. L'expression du tag HA n'est révélée que dans les cellules transfectées avec le plasmide codant pour Lamp2b-HA. D'autre part, des immunoprécipitations ont été réalisées avec des billes magnétiques dirigées contre les tags HA et c-myc, à partir des milieux de cultures issus de chacun des types de cellules, ou bien de milieux de cultures mélangés. La révélation de l'expression du tag HA suite aux essais d'immunopurification montrent que l'expression de ce dernier est révélée uniquement lorsque les billes dirigées contre le tag HA ont été appliquées dans un milieu de culture contenant des EVs marquées HA.

4. Discussion et perspectives.

L'objectif de ce travail était de mettre au point une méthode de purification qui permet d'isoler les EVs en tenant compte de leur origine cellulaire : neuronale ou gliale. La stratégie consiste à faire exprimer une protéine de surface localisée à la membrane des EVs, marquée d'une étiquette, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du type cellulaire d'intérêt. Les EVs sont ensuite collectées par immunopurification, à l'aide de billes magnétiques greffées d'anticorps dirigés contre le tag. Nous avons développé et testé plusieurs stratégies : deux protéines différentes exprimées à la surface des EVs, divers marqueurs spécifiques, la protection des tags avec des glycosylations ou non, et plusieurs méthodes de transfection des constructions. Les tests préliminaires des constructions ont été réalisés dans la lignée cellulaire HEK 293, et étaient très prometteurs. Néanmoins, jusqu'à présent, aucune de nos stratégies n'a été concluante dans notre modèle de culture primaire de neurones d'hippocampe.

L'intérêt pour l'étude des EVs se fait grandissant de la part de la communauté scientifique, et les questions biologiques sous-jacentes posées nécessitent de pouvoir collecter les EVs à partir de tissus de système nerveux. Cela permettra d'étudier le mécanisme *in vivo*. Par conséquent, il existe une optimisation et un développement de techniques de purification des EVs adaptées aux tissus du système nerveux. Par exemple, une récente étude a mis au point une méthode qui permet de purifier les EVs libérées dans l'espace extracellulaire de tissus provenant de l'encéphale. Elle consiste à la dissociation douce du tissu, suivie d'étapes de centrifugations à faible vitesse, de filtration, et d'ultracentrifugations (Pérez-González et al., 2017). Aussi, le protocole de purification par ultracentrifugations à été optimisé pour récupérer les EVs à partir de tissu humain de SNC (Vella et al., 2017).

En revanche, il n'existe actuellement pas d'outils qui permet de purifier les EVs selon leur origine cellulaire. Ce manque technologique limite la compréhension du rôle des EVs de chacun des types cellulaires du SNC. La stratégie que nous souhaitons mettre en place fonctionne dans des lignées cellulaires, mais ne fonctionne pas dans les cultures primaires d'hippocampe et de neurones. De plus, nous n'avons pas réussi à retrouver les tags HA et Flag suite à l'électroporation dans les cultures primaires de neurones du plasmide Lamp2b-HA-Flag réalisé par Hung et Leonard (Hung and Leonard, 2015). Notre

hypothèse est que le problème vient du modèle cellulaire que nous utilisons pour mettre au point nos outils. En effet, les cultures primaires sont pratiques et faciles à réaliser, cependant elles ne miment pas parfaitement la réalité de la physiologie du SNC. Pour vérifier notre hypothèse, il serait intéressant de faire des tests de nos outils sur des tranches d'hippocampe ou de cortex.

Avec de tels outils, nous souhaitons purifier les EVs de chacun des grands types cellulaires du SNC, pour réaliser une analyse extensive et comparative de leur composition. Nous émettons l'hypothèse qu'il existe un ou plusieurs marqueurs de surface des EVs qui soient spécifiques d'un type cellulaire par rapport aux autres. Notre étude aurait permis, dans un premier temps, de mettre en place une stratégie de purification par immunoprécipitation, contre des marqueurs de surface physiologiques présents naturellement à la membrane des EVs. Dans un second temps, nous souhaitons nous intéresser au rôle des EVs selon leur origine cellulaire, dans la physiologie du SNC.

Pour conclure, la mise au point d'outil de purification des EVs spécifiques de chacun des types cellulaires du SNC nous semble indispensable pour appréhender le rôle de la voie de communication par les EVs dans le SNC, et *in fine*, de mieux comprendre la physiologie du SNC.

Ouverture générale et conclusion de la thèse

Le travail de ma thèse vise à comprendre le rôle des miARNs dans la physiologie du système nerveux, et à leur transport entre les cellules par les EVs. Néanmoins, l'étude des miARNs, des EVs, et des miARNs vésiculaires peut s'inscrire dans une perspective clinique, avec une visée d'aide au diagnostique et de thérapeutique.

1. Les miARNs et les EVs pour un diagnostique clinique des pathologies cérébrales.

Les miARNs jouent un rôle déterminant dans la physio-pathologie de diverses maladies, dont les maladies neurodégénératives et les tumeurs cérébrales. La dérégulation de leur expression, corrélée avec l'apparition et la progression de la pathologie, font des miARNs des biomarqueurs pertinents (Huang, 2017).

Plus spécifiquement, les miARNs circulants dans les fluides biologiques, comme le sang ou le liquide céphalo-rachidien, proposent des perspectives intéressantes comme biomarqueurs non-invasifs de pathologies (Yu and Li, 2016). C'est particulièrement le cas des miARNs circulants dans le liquide céphalo-rachidien, qui permettent aux cliniciens d'évaluer l'état physio-pathologique du système nerveux, difficile d'accès (Santangelo et al., 2017). Les miARNs circulants dans les fluides biologiques sont souvent protégés dans les EVs (Zhang et al., 2017). Cela implique que la purification des EVs à partir de fluides biologiques est une alternative pertinente pour révéler la présence de biomarqueurs.

Lai et Friedman ont développé un modèle mathématique à partir de données d'échantillons de patients souffrants d'un cancer colorectal. Ce cancer est difficile à détecter car la méthode de coloscopie requise est invasive et onéreuse. Les simulations du modèle montrent une étroite relation et corrélation entre la taille de la tumeur et la quantité de miARNs dans les exosomes, purifiés à partir d'échantillons de sang. Les miARNs étudiés correspondent à ceux connus comme étant sur-exprimés par les cellules tumorales. Les auteurs concluent que la quantification des miARNs exosomaux à partir d'échantillon de sang de patients est un modèle pertinent en clinique pour détecter aisément et rapidement l'apparition d'un cancer colorectal (Lai and Friedman, 2017).

Ainsi, à l'avenir les miARNs vésiculaires pourraient devenir des biomarqueurs standards pour la détection et l'évaluation de la progression de tumeurs et autres pathologies, comme pour les maladies neurodégénératives par exemple.

2. Les miARNs et les EVs comme outils thérapeutiques.

La dérégulation de l'expression des miARNs intervient dans la physio-pathologie de nombreuses maladies, ainsi ils font des cibles thérapeutiques de choix. Les stratégies thérapeutiques dirigées contre les miARNs sont divisées en deux classes (van Rooij and Kauppinen, 2014):

- La restauration de l'expression d'un miARN inhibé, par l'utilisation d'un miARN « *mimic* » (miARN de synthèse, agoniste).
- L'inhibition de l'expression d'un miARN sur-exprimé de manière aberrante, par l'utilisation d'un anti-miR ou encore d'éponges à miARNs (antagoniste).

Il existe actuellement plusieurs miARNs qui sont en phase d'essais dans des études cliniques, dont le miR-122 contre l'hépatite C, le miR-15/16 dans l'adénocarcinome du poumon, et le miR-155 chez des patients atteints de lymphome cutané (Catela Ivkovic et al., 2017).

Cependant, l'utilisation de miARNs thérapeutiques dans le système nerveux doit dépasser plusieurs limitations :

- la faible stabilité des acides ribonucléiques qui sont sujets aux dégradations enzymatiques dans le milieu extracellulaire avant d'atteindre la cellule cible ;
- la traversée de la barrière hémato-encéphalique pour pénétrer dans l'encéphale ;
- la durée de vie et de stabilité des miARNs thérapeutiques qui s'expriment dans des cellules qui se renouvellent peu.

Le développement de vecteurs de délivrance des miARNs thérapeutiques (*mimic* et anti-miR) est un véritable défi à relever. Ce dernier doit adresser le miARN thérapeutique aux bonnes cellules pour éviter les effets secondaires. Aussi, le vecteur doit être stable, permettre la protection, le transport et l'entrée dans la cellule du miARN thérapeutique, et ne doit pas déclencher de réponse immunitaire (Wen, 2016). Il existe plusieurs vecteurs qui permettent de transporter les miARNs thérapeutiques, qui sont résumés dans les revues

suivantes (Catela Ivkovic et al., 2017; Wen, 2016), et dont les principales stratégies sont les suivantes :

- des virus ;
- des liposomes ;
- des nanoparticules ;
- la modification chimique de la séquence pour les protéger des dégradations et les rendre plus stables.

Les EVs, en particulier les exosomes, sont actuellement vus comme une perspective de vecteur thérapeutique d'avenir, en particulier pour cibler les pathologies cérébrales (Patel and Patel, 2017; Rufino-Ramos et al., 2017; Zappulli et al., 2016). En effet, leur membrane naturelle lipidique leur confère une stabilité dans les fluides corporels, protège les molécules empaquetées des dégradations enzymatiques et immunitaires, et leur permet de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'atteindre l'encéphale (Rufino-Ramos et al., 2017) (Tableau 10).

Tableau 10: Les EVs, un vecteur thérapeutique d'avenir ?

Avantages	Inconvénients	Références
<ul style="list-style-type: none"> • vésicules endogènes • capacité d'être recapturée inhérente • grande efficacité de recapture par les cellules • ne sont pas reconnues comme étrangères par le système immunitaire • peu immunogènes • biocompatibles et stables • peu toxiques • peuvent être chargées avec des molécules exogènes • capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique 	<ul style="list-style-type: none"> • l'impact sur les cellules cibles est peu connu • le suivi et traçage <i>in vivo</i> nécessite du développement technique • pas de méthode de purification optimale • les techniques de purification sont peu rentables • la production de masse est onéreuse et délicate 	(Alvarez-Erviti et al., 2011; Ha et al., 2016; van der Pol et al., 2012; Raposo and Stoorvogel, 2013; Taylor and Shah, 2015; Turturici et al., 2014; Yoo et al., 2011b)

Le tableau est largement inspiré de : (Rufino-Ramos et al., 2017).

L'utilisation des EVs transportant des miRNAs comme vecteur thérapeutique a été testée *in vitro* sur un modèle de tumeur cérébrale. Une démonstration robuste montre qu'un anti-miR-9 empaqueté dans des exosomes de cellules souches mésenchymateuses est

délivré dans des cellules de glioblastomes résistantes à un traitement de chimiothérapie, et permet de contrer les mécanismes de résistance de la tumeur. Cela permet d'éliminer ensuite la tumeur par un traitement de chimiothérapie (Munoz et al., 2013). Deux autres études utilisent aussi les EVs pour introduire les miR-146b (Katakowski et al., 2010) et miR-1 (Bronisz et al., 2014) dans des cellules de gliome et de glioblastome respectivement. Ces miARNs sont connus pour être des suppresseurs de tumeur. Leurs résultats montrent que les miARNs sont transférés dans les cellules tumorales, et diminuent leur progression et leur prolifération.

Ainsi, l'utilisation des miARNs comme molécules thérapeutiques, et des EVs comme vecteurs thérapeutiques est prometteuse. Le défi principal à relever pour améliorer les perspectives thérapeutiques des EVs comme vecteur, est le contrôle de leur adressage aux cellules pathologiques.

3. Conclusion générale.

Le travail de cette thèse a consisté à étudier l'expression des miARNs dans des structures du SNC, leur rôle dans la régulation de la plasticité neuronale, ainsi que leur échange entre les différentes cellules du SNC, en condition physiologique.

Nous avons montré, par RNA-Seq, que les miARNs sont différentiellement exprimés entre différentes structures du SNC. Cette technologie nous a également permis de révéler la présence de nouvelles espèces de miARNs. Ces résultats suggèrent que l'expression des miARNs (connus et nouveaux) participe à la signature transcriptomique singulière de chacune des structures.

Nous avons aussi dévoilé le rôle spécifique du miR-92a, dans le contrôle de l'expression du GluA1, dans un paradigme de plasticité synaptique homéostatique dans lequel l'activité synaptique est inhibée.

De plus, notre travail montre que les miARNs peuvent être échangés entre les cellules du système nerveux via les EVs. Le contenu des EVs en miARNs varie en fonction de l'activité neuronale, et ces derniers ont pour cibles prédictibles des protéines impliquées dans la régulation de la plasticité neuronale. Nos résultats suggèrent donc que l'échange de miARNs via les EVs est un nouveau mécanisme de modulation de la plasticité neuronale.

Enfin, nous proposons une stratégie pour développer un nouvel outil de purification des EVs. Cet outil envisage la possibilité de purifier les EVs du SNC selon leur origine cellulaire.

Pour conclure, ce travail de thèse met en lumière le rôle crucial des miARNs dans la régulation physiologique des fonctions du SNC.

Curriculum vitae

FORMATION

2013-2017 : *Réalisation de la thèse en neurosciences, Rôle des miARNs cellulaires et vésiculaires dans la régulation transcriptomique du système nerveux.* Encadrement par Alexandre FAVEREAUX, équipe Mécanismes centraux de la sensibilisation à la douleur, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, Bordeaux.

Techniques expérimentales : cultures de lignées cellulaires et cultures primaires de neurones d'hippocampe et de cortex, extraction et quantification d'ARN, RT qPCR et RNA-Seq, clonage, PCR, Western Blot, immunocytochimie, hybridation *in situ*, microscopie à épifluorescence, essais de rapporteur luciférase, purification des vésicules extracellulaires.

Activité complémentaire : 1 an de contrat de tutorat en Biologie Cellulaire (2014).

Financements obtenus pour du salaire :

1 an de financement de la part de la Fondation pour la Recherche Médicale.

3 ans de financement de la part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

2016-2017 : *Master 2 Innovation et Valorisation de la Recherche*, réalisé à distance, Faculté Jean-Monnet, Université Paris-Sud. Mention Bien.

2011-2013 : *Master 1 et 2 Biologie Cellulaire, Physiologie, Pathologie*, Université de Bordeaux. Mention Bien.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Mathieu Letellier, Sara Elramah, Magali Mondin, Anaïs Soula, Andrew Penn, Daniel Choquet, Olivier Thoumine, Alexandre Favereaux, *miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling*, **Nature neuroscience**, 17(8) :1040-1042, 2014.

Maria-Jose Lopez-Gonzalez, Anaïs Soula, Marc Landry, Alexandre Favereaux, *Over-expression of miR-204 by oxaliplatin treatment impairs neuronal arborization through plexin A2 semaphorin receptor*, **en révision chez Journal of Neurochemistry**.

Anaïs Soula, Mélissa Valere, Maria-Jose Lopez-Gonzalez, Alexis Groppi, Marc Landry, Macha Nikolski, Alexandre Favereaux, *RNA-Seq reveals novel miRNAs shaping the transcriptomic identity of rat brain structure*, **en préparation**.

Anaïs Soula, Melina Petrel, Yves Le Feuvre, Jean-William Dupuy, André Calas, Alain Trembleau, Marc Landry, Alexandre Favereaux, *Extracellular vesicles released by hippocampal*

cultures contain a miRNA repertoire regulated by neuronal activity which induces transcriptomic regulation in recipient cells, en préparation.

PRESENTATIONS ORALES

2017 : Journée de rassemblement de la Biologie Cellulaire de Bordeaux.

2016 : Présentation courte à la Keystone Conference »*Exosomes/microvesicles : novel mechanisms of cell-cell communication* », Keystone, Colorado, Etats-Unis. Bénéficiaire d'une bourse de déplacement d'une valeur de 1200 dollars.

2016 : Journée des jeunes chercheurs de Bordeaux. Récompensée du 3^{ième} prix de la meilleure communication orale.

2016 : Présentation devant l'équipe d'Anastasia Khvorova, Medical Chemistry of Therapeutic RNAs, Worcester, Massachussets, Etats-Unis.

2016 : Présentation devant l'Institut Massachussets General Hospital, Boston, Massachussets, Etats-Unis.

2016 : Présentation devant l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, Bordeaux.

PRESENTATIONS AFFICHEES

2017 : Congrès international de la Société Française des Neurosciences, Bordeaux. Participation à l'organisation de la session des ateliers orientation : « Orientation dans le secteur privé avec un doctorat ».

2016 : Gordon Conference « *Extracellular vesicles* », Sunday River, Massachussets, Etats-Unis.

2016 : Keystone Conference »*Exosomes/microvesicles : novel mechanisms of cell-cell communication* », Keystone, Colorado, Etats-Unis.

2015 : Congrès international de la Société Française des Neurosciences, Montpellier.

2014 : Symposium du club ARN de Bordeaux.

2013 : Congrès international de la Société Américaine des Neurosciences, San Siego, Californie, Etats-Unis.

ENGAGEMENT ASSOCIATIF

Association des Docteurs et Doctorants de Biologie de Bordeaux- 2D2B

2014-2017 :

- Organisation annuelle de la **Journée de l'Ecole doctorale** des Sciences de la Vie et de la Santé.
- Organisation annuelle de l'événement **Pint of Science** Bordeaux.
- Participation à l'événement 2017 de la **Marche pour la Science**- vulgarisation de l'histoire de la vaccination.
- **Aide à la préparation du concours d'entrée** de l'Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé.
- Organisation **d'évènements de réseautage** pour les doctorants : soirées, dégustation de vin, tournoi de jeu de cartes.

Bibliographie

- Abels, E.R., and Breakefield, X.O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 301–312.
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M.J., Krantz, B.A., Leppla, S.H., and van der Goot, F.G. (2013). Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell Rep.* *5*, 986–996.
- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., and Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife* *4*.
- Agostini, M., Tucci, P., Steinert, J.R., Shalom-Feuerstein, R., Rouleau, M., Aberdam, D., Forsythe, I.D., Young, K.W., Ventura, A., Concepcion, C.P., et al. (2011a). microRNA-34a regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21099–21104.
- Agostini, M., Tucci, P., Killick, R., Candi, E., Sayan, B.S., Rivetti di Val Cervo, P., Nicotera, P., McKeon, F., Knight, R.A., Mak, T.W., et al. (2011b). Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21093–21098.
- Aksoy-Aksel, A., Zampa, F., and Schratt, G. (2014). MicroRNAs and synaptic plasticity--a mutual relationship. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*.
- Alexander, R.P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M., and Gerstein, M.B. (2010). Annotating non-coding regions of the genome. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 559–571.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* *10*, 619–624.
- Altick, A.L., Baryshnikova, L.M., Vu, T.Q., and von Bartheld, C.S. (2009). Quantitative analysis of multivesicular bodies (MVBs) in the hypoglossal nerve: evidence that neurotrophic factors do not use MVBs for retrograde axonal transport. *J. Comp. Neurol.* *514*, 641–657.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhai, S., and Wood, M.J.A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* *29*, 341–345.
- An, J., Lai, J., Sajjanhar, A., Lehman, M.L., and Nelson, C.C. (2014). miRPlant: an integrated tool for identification of plant miRNA from RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* *15*, 275.
- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., Novellino, L., Clementi, E., Giussani, P., Viani, P., et al. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J.* *31*, 1231–1240.
- Aoto, J., Nam, C.I., Poon, M.M., Ting, P., and Chen, L. (2008). Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* *60*, 308–320.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999a). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* *22*, 208–215.
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., and Haydon, P.G. (1999b). Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *77*, 699–706.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* *81*, 728–739.

Bibliographie

- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* 5, 337–350.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805–809.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., 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, 5003–5008.
- Ashraf, S.I., McLoon, A.L., Sclarsic, S.M., and Kunes, S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 124, 191–205.
- Avraham, R., Sas-Chen, A., Manor, O., Steinfeld, I., Shalgi, R., Tarcic, G., Bossel, N., Zeisel, A., Amit, I., Zwang, Y., et al. (2010). EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors. *Sci. Signal.* 3, ra43.
- Awojoodu, A.O., Keegan, P.M., Lane, A.R., Zhang, Y., Lynch, K.R., Platt, M.O., and Botchwey, E.A. (2014). Acid sphingomyelinase is activated in sickle cell erythrocytes and contributes to inflammatory microparticle generation in SCD. *Blood* 124, 1941–1950.
- Axelrod, D., Thompson, N.L., and Burghardt, T.P. (1983). Total internal reflection fluorescent microscopy. *J. Microsc.* 129, 19–28.
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Jacob Filho, W., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.
- Babak, T., Zhang, W., Morris, Q., Blencowe, B.J., and Hughes, T.R. (2004). Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA N. Y. N* 10, 1813–1819.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22, 2773–2785.
- Babiarz, J.E., Hsu, R., Melton, C., Thomas, M., Ullian, E.M., and Blelloch, R. (2011). A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in *Dgcr8* versus *Dicer1* knockouts and small RNA sequencing. *RNA N. Y. N* 17, 1489–1501.
- Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T.J., Jayaprakash, A.D., Sachidanandam, R., and Brown, B.D. (2011). Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. *Curr. Biol. CB* 21, 369–376.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64–71.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553–563.
- Bahrini, I., Song, J., Diez, D., and Hanayama, R. (2015). Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci. Rep.* 5, 7989.

Bibliographie

- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., et al. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* *14*, 677–685.
- Bak, M., Silahatoglu, A., Møller, M., Christensen, M., Rath, M.F., Skryabin, B., Tommerup, N., and Kauppinen, S. (2008). MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA N. Y. N* *14*, 432–444.
- Bakhti, M., Winter, C., and Simons, M. (2011). Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.* *286*, 787–796.
- van Balkom, B.W.M., Eisele, A.S., Pegtel, D.M., Bervoets, S., and Verhaar, M.C. (2015). Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J. Extracell. Vesicles* *4*, 26760.
- Banerjee, S., Neveu, P., and Kosik, K.S. (2009). A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron* *64*, 871–884.
- Banzhaf-Strathmann, J., Benito, E., May, S., Arzberger, T., Tahirovic, S., Kretschmar, H., Fischer, A., and Edbauer, D. (2014). MicroRNA-125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease. *EMBO J.* *33*, 1667–1680.
- Bar, M., Wyman, S.K., Fritz, B.R., Qi, J., Garg, K.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Bendoraitis, A., Mitchell, P.S., Nelson, A.M., et al. (2008). MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 2496–2505.
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., et al. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* *14*, 2486–2494.
- Bardy, C., van den Hurk, M., Eames, T., Marchand, C., Hernandez, R.V., Kellogg, M., Gorris, M., Galet, B., Palomares, V., Brown, J., et al. (2015). Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E2725-2734.
- Barrès, C., Blanc, L., Bette-Bobillo, P., André, S., Mamoun, R., Gabius, H.-J., and Vidal, M. (2010). Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* *115*, 696–705.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281–297.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215–233.
- Basak, I., Patil, K.S., Alves, G., Larsen, J.P., and Møller, S.G. (2016). microRNAs as neuroregulators, biomarkers and therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 811–827.
- Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA N. Y. N* *11*, 241–247.
- Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonné, R., and Bertrand, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* *31*, 6593–6597.
- Batagov, A.O., and Kurochkin, I.V. (2013). Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol. Direct* *8*, 12.

- Batagov, A.O., Kuznetsov, V.A., and Kurochkin, I.V. (2011). Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics* 12 Suppl 3, S18.
- Beer, K.B., and Wehman, A.M. (2017). Mechanisms and functions of extracellular vesicle release in vivo-What we can learn from flies and worms. *Cell Adhes. Migr.* 11, 135–150.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885–1898.
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell* 28, 328–336.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36, D149-153.
- Bezzi, P., and Volterra, A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 387–394.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., and Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124.
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., and Verderio, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 7268–7277.
- Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E.H., Furlan, R., Clementi, E., et al. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* 28, 1043–1054.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., and Boddeke, H.W.G.M. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30, 596–602.
- Bicker, S., Khudayberdiev, S., Weiß, K., Zocher, K., Baumeister, S., and Schratt, G. (2013). The DEAH-box helicase DHX36 mediates dendritic localization of the neuronal precursor-microRNA-134. *Genes Dev.* 27, 991–996.
- Bicker, S., Lackinger, M., Weiß, K., and Schratt, G. (2014). MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71, 3987–4005.
- Bobrie, A., Krumeich, S., Reyat, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Théry, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* 72, 4920–4930.
- Böing, A.N., van der Pol, E., Grootemaat, A.E., Coumans, F.A.W., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles* 3.

Bibliographie

- Bolukbasi, M.F., Mizrak, A., Ozdener, G.B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E.P., Fan, J.-B., Breakefield, X.O., and Saydam, O. (2012). miR-1289 and “Zipcode”-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *1*, e10.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1097–1101.
- Boutz, P.L., Chawla, G., Stoilov, P., and Black, D.L. (2007). MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev.* *21*, 71–84.
- Bradl, M., and Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *119*, 37–53.
- Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S.A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., et al. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1146–1153.
- Bredt, D.S., and Nicoll, R.A. (2003). AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* *40*, 361–379.
- Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* *310*, 486–489.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* *113*, 25–36.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* *3*, e85.
- Brenner, M., Kisseberth, W.C., Su, Y., Besnard, F., and Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *14*, 1030–1037.
- Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M.O., Peruzzi, P., Ansari, K., Ogawa, D., Balaj, L., De Rienzo, G., Mineo, M., Nakano, I., et al. (2014). Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer Res.* *74*, 738–750.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Nishibu, T., Ukekawa, R., Funakoshi, T., Kurokawa, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., et al. (2010). A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome Res.* *20*, 1398–1410.
- Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N.M., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., Raposo, G., Wubbolts, R., et al. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic Cph. Den.* *10*, 1528–1542.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* *10*, 1957–1966.
- Campbell, D.S., and Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* *32*, 1013–1026.
- Candiani, S., Moronti, L., Pennati, R., De Bernardi, F., Benfenati, F., and Pestarino, M. (2010).

Bibliographie

- The synapsin gene family in basal chordates: evolutionary perspectives in metazoans. *BMC Evol. Biol.* *10*, 32.
- Catela Ivkovic, T., Voss, G., Cornella, H., and Ceder, Y. (2017). microRNAs as cancer therapeutics: A step closer to clinical application. *Cancer Lett.* *407*, 113–122.
- Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F., and Benfenati, F. (2010). The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog. Neurobiol.* *91*, 313–348.
- Cha, D.J., Franklin, J.L., Dou, Y., Liu, Q., Higginbotham, J.N., Demory Beckler, M., Weaver, A.M., Vickers, K., Prasad, N., Levy, S., et al. (2015). KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *ELife* *4*, e07197.
- Chandrasekar, V., and Dreyer, J.-L. (2009). microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* *42*, 350–362.
- Chang, F., Zhang, L.-H., Xu, W.-P., Jing, P., and Zhan, P.-Y. (2014). microRNA-9 attenuates amyloid β -induced synaptotoxicity by targeting calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2. *Mol. Med. Rep.* *9*, 1917–1922.
- Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* *40*, 43–50.
- Charalambous, D.C., Pasciuto, E., Mercaldo, V., Pilo Boyl, P., Munck, S., Bagni, C., and Santama, N. (2013). KIF1B β transports dendritically localized mRNPs in neurons and is recruited to synapses in an activity-dependent manner. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 335–356.
- Charlotte Javalet (2016). Rôle des exosomes comme nouvelle voie de communication entre les neurones. Institut des Neurosciences de Grenoble.
- Chekulaeva, M., and Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 452–460.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* *465*, 584–589.
- Chen, Y.-L., and Shen, C.-K.J. (2013). Modulation of mGluR-dependent MAP1B translation and AMPA receptor endocytosis by microRNA miR-146a-5p. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 9013–9020.
- Chen, C.C., Liu, L., Ma, F., Wong, C.W., Guo, X.E., Chacko, J.V., Farhoodi, H.P., Zhang, S.X., Zimak, J., Ségaliny, A., et al. (2016). Elucidation of Exosome Migration across the Blood-Brain Barrier Model In Vitro. *Cell. Mol. Bioeng.* *9*, 509–529.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740–744.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* *447*, 823–828.
- Cheng, H.-Y.M., Papp, J.W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J.P., Nakazawa, T., Shimizu, K., Okamura, H., Impey, S., et al. (2007). microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* *54*, 813–829.

Bibliographie

- Cheng, L., Sharples, R.A., Scicluna, B.J., and Hill, A.F. (2014). Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J. Extracell. Vesicles* 3.
- Chevillet, J.R., Kang, Q., Ruf, I.K., Briggs, H.A., Vojtech, L.N., Hughes, S.M., Cheng, H.H., Arroyo, J.D., Meredith, E.K., Gallichotte, E.N., et al. (2014). Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 14888–14893.
- Chi, K.R. (2008). The year of sequencing. *Nat. Methods* 5, 11–14.
- Chiasserini, D., van Weering, J.R.T., Piersma, S.R., Pham, T.V., Malekzadeh, A., Teunissen, C.E., de Wit, H., and Jiménez, C.R. (2014). Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J. Proteomics* 106, 191–204.
- Chicurel, M.E., and Harris, K.M. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 325, 169–182.
- Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R.W., and Dhir, R. (2006). Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 169, 1812–1820.
- Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F.J., and Sadoul, R. (2014). Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J. Extracell. Vesicles* 3, 24722.
- Choudhuri, K., Llodrá, J., Roth, E.W., Tsai, J., Gordo, S., Wucherpfennig, K.W., Kam, L.C., Stokes, D.L., and Dustin, M.L. (2014). Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature* 507, 118–123.
- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E.M., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2017). Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem. Sci.* 42, 42–56.
- Christensen, M., Larsen, L.A., Kauppinen, S., and Schratt, G. (2010). Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated microRNA Delivery into the Postnatal Mouse Brain Reveals a Role for miR-134 in Dendritogenesis in Vivo. *Front. Neural Circuits* 3, 16.
- Christianson, H.C., Svensson, K.J., van Kuppevelt, T.H., Li, J.-P., and Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17380–17385.
- Chu, C., and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* 4, e210.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., et al. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694–1698.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 18–41.
- Clark, M.R. (2011). Flippin' lipids. *Nat. Immunol.* 12, 373–375.
- Claycomb, J.M. (2014). Ancient endo-siRNA pathways reveal new tricks. *Curr. Biol. CB* 24, R703-715.

Bibliographie

- Cohen, J.E., Lee, P.R., Chen, S., Li, W., and Fields, R.D. (2011). MicroRNA regulation of homeostatic synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11650–11655.
- Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., and Wang, Y.T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 952–962.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Théry, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* *126*, 5553–5565.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 255–289.
- Connors, B.W., and Long, M.A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* *27*, 393–418.
- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M., and Fiala, J.C. (2002). Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 2215–2224.
- Cossetti, C., Iraci, N., Mercer, T.R., Leonardi, T., Alpi, E., Drago, D., Alfaro-Cervello, C., Saini, H.K., Davis, M.P., Schaeffer, J., et al. (2014). Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- γ via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Mol. Cell* *56*, 193–204.
- Crawford, N. (1971). The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *Br. J. Haematol.* *21*, 53–69.
- Creighton, C.J., Reid, J.G., and Gunaratne, P.H. (2009). Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief. Bioinform.* *10*, 490–497.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T.G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E.I., and Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* *2*.
- Darios, F., Wasser, C., Shakirzyanova, A., Giniatullin, A., Goodman, K., Munoz-Bravo, J.L., Raingo, J., Jorgacevski, J., Kreft, M., Zorec, R., et al. (2009). Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* *62*, 683–694.
- Das, S.K., Sokhi, U.K., Bhutia, S.K., Azab, B., Su, Z.-Z., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2010). Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11948–11953.
- D'Asti, E., Chennakrishnaiah, S., Lee, T.H., and Rak, J. (2016). Extracellular Vesicles in Brain Tumor Progression. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 383–407.
- Davis, T.H., Cuellar, T.L., Koch, S.M., Barker, A.J., Harfe, B.D., McManus, M.T., and Ullian, E.M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 4322–4330.
- Davis-Dusenbery, B.N., and Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem. (Tokyo)* *148*, 381–392.
- Desvignes, T., Batzel, P., Berezikov, E., Eilbeck, K., Eppig, J.T., McAndrews, M.S., Singer, A., and Postlethwait, J.H. (2015). miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet. TIG* *31*, 613–626.

Bibliographie

- Dhar, M., Zhu, M., Impey, S., Lambert, T.J., Bland, T., Karatsoreos, I.N., Nakazawa, T., Appleyard, S.M., and Wayman, G.A. (2014). Leptin induces hippocampal synaptogenesis via CREB-regulated microRNA-132 suppression of p250GAP. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28, 1073–1087.
- Didiano, D., and Hobert, O. (2006). Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 849–851.
- Didiano, D., and Hobert, O. (2008). Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *RNA N. Y. N* 14, 1297–1317.
- Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097–1108.
- Dill, H., Linder, B., Fehr, A., and Fischer, U. (2012). Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, *ctdsp2*. *Genes Dev.* 26, 25–30.
- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504–511.
- Doench, J.G., Petersen, C.P., and Sharp, P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17, 438–442.
- Duan, D., Zheng, K., Shen, Y., Cao, R., Jiang, L., Lu, Z., Yan, X., and Li, J. (2011). Label-free high-throughput microRNA expression profiling from total RNA. *Nucleic Acids Res.* 39, e154.
- Dutta, R., Chomyk, A.M., Chang, A., Ribaldo, M.V., Deckard, S.A., Doud, M.K., Edberg, D.D., Bai, B., Li, M., Baranzini, S.E., et al. (2013). Hippocampal demyelination and memory dysfunction are associated with increased levels of the neuronal microRNA miR-124 and reduced AMPA receptors. *Ann. Neurol.* 73, 637–645.
- Eacker, S.M., Keuss, M.J., Berezikov, E., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2011). Neuronal activity regulates hippocampal miRNA expression. *PLoS One* 6, e25068.
- Eacker, S.M., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2013). The interplay of microRNA and neuronal activity in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 136.
- Earls, L.R., Fricke, R.G., Yu, J., Berry, R.B., Baldwin, L.T., and Zakharenko, S.S. (2012). Age-dependent microRNA control of synaptic plasticity in 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 14132–14144.
- Edbauer, D., Neilson, J.R., Foster, K.A., Wang, C.-F., Seeburg, D.P., Batterton, M.N., Tada, T., Dolan, B.M., Sharp, P.A., and Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65, 373–384.
- Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Malmhäll, C., Bossios, A., Eldh, M., and Lötvall, J. (2012). Characterization of mRNA and microRNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells. *J. Extracell. Vesicles* 1.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188–200.
- Elias, G.M., and Nicoll, R.A. (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* 17, 343–352.
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol. Cell*

32, 519–528.

Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 5, R1.

Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., and Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 11, 108.

Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S.-F., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007a). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* 21, 2558–2570.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007b). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 9–22.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007c). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol. Cell Biol.* 27, 3970–3981.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9–14.

Eystathioy, T., Chan, E.K.L., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Griffith, K., and Fritzler, M.J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell* 13, 1338–1351.

Eystathioy, T., Jakymiw, A., Chan, E.K.L., Séraphin, B., Cougot, N., and Fritzler, M.J. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA N. Y. N* 9, 1171–1173.

Fader, C.M., Sánchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1901–1916.

Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J.A., and Guo, F. (2007). Heme is involved in microRNA processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 23–29.

Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., et al. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 642–648.

Felgner, P.L., and Ringold, G.M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337, 387–388.

Fénelon, K., Mukai, J., Xu, B., Hsu, P.-K., Drew, L.J., Karayiorgou, M., Fischbach, G.D., Macdermott, A.B., and Gogos, J.A. (2011). Deficiency of *Dgcr8*, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4447–4452.

Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., and Sui, S.-F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic Cph. Den.* 11, 675–687.

Fields, R.D., Woo, D.H., and Basser, P.J. (2015). Glial Regulation of the Neuronal Connectome through Local and Long-Distant Communication. *Neuron* 86, 374–386.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.

Bibliographie

- Fineberg, S.K., Kosik, K.S., and Davidson, B.L. (2009). MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron* *64*, 303–309.
- Fiore, R., Khudayberdiev, S., Christensen, M., Siegel, G., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Greenberg, M.E., and Schratt, G. (2009). Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J.* *28*, 697–710.
- Fiore, R., Rajman, M., Schwale, C., Bicker, S., Antoniou, A., Bruehl, C., Draguhn, A., and Schratt, G. (2014). MiR-134-dependent regulation of Pumilio-2 is necessary for homeostatic synaptic depression. *EMBO J.* *33*, 2231–2246.
- Fiorenza, A., Lopez-Atalaya, J.P., Rovira, V., Scandaglia, M., Geijo-Barrientos, E., and Barco, A. (2016). Blocking miRNA Biogenesis in Adult Forebrain Neurons Enhances Seizure Susceptibility, Fear Memory, and Food Intake by Increasing Neuronal Responsiveness. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *26*, 1619–1633.
- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., and Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* *124*, 447–458.
- Fiumara, F., Rajasethupathy, P., Antonov, I., Kosmidis, S., Sossin, W.S., and Kandel, E.R. (2015). MicroRNA-22 Gates Long-Term Heterosynaptic Plasticity in Aplysia through Presynaptic Regulation of CPEB and Downstream Targets. *Cell Rep.* *11*, 1866–1875.
- Flavell, S.W., and Greenberg, M.E. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* *31*, 563–590.
- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Collier, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14879–14884.
- Fornasiero, E.F., Bonanomi, D., Benfenati, F., and Valtorta, F. (2010). The role of synapsins in neuronal development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *67*, 1383–1396.
- Forterre, A., Jalabert, A., Chikh, K., Pesenti, S., Euthine, V., Granjon, A., Errazuriz, E., Lefai, E., Vidal, H., and Rome, S. (2014). Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell Cycle Georget. Tex* *13*, 78–89.
- Franke, K., Otto, W., Johannes, S., Baumgart, J., Nitsch, R., and Schumacher, S. (2012). miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling. *EMBO J.* *31*, 2908–2921.
- Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J. (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell* *32*, 605–615.
- Franzoni, E., Booker, S.A., Parthasarathy, S., Rehfeld, F., Grosser, S., Srivatsa, S., Fuchs, H.R., Tarabykin, V., Vida, I., and Wulczyn, F.G. (2015). miR-128 regulates neuronal migration, outgrowth and intrinsic excitability via the intellectual disability gene Phf6. *ELife* *4*.
- Friedländer, M.R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knespel, S., and Rajewsky, N. (2008). Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat. Biotechnol.* *26*, 407–415.
- Friedländer, M.R., Mackowiak, S.D., Li, N., Chen, W., and Rajewsky, N. (2012). miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* *40*, 37–52.

- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Fröhlich, D., Kuo, W.P., Frühbeis, C., Sun, J.-J., Zehendner, C.M., Luhmann, H.J., Pinto, S., Toedling, J., Trotter, J., and Krämer-Albers, E.-M. (2014). Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A.S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbels, S., Nave, K.-A., et al. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* *11*, e1001604.
- Fukuda, T., Itoh, M., Ichikawa, T., Washiyama, K., and Goto, Y. (2005). Delayed maturation of neuronal architecture and synaptogenesis in cerebral cortex of Mesp2-deficient mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 537–544.
- Gabrielli, M., Battista, N., Riganti, L., Prada, I., Antonucci, F., Cantone, L., Lombardi, M., Matteoli, M., Maccarrone, M., and Verderio, C. (2015). Active endocannabinoids are secreted on the surface of microglial microvesicles. *SpringerPlus* *4*, L29.
- Gaidatzis, D., van Nimwegen, E., Hausser, J., and Zavolan, M. (2007). Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics* *8*, 69.
- Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, G.V., Ciafrè, S.A., and Farace, M.G. (2007). miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J. Biol. Chem.* *282*, 23716–23724.
- Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., et al. (2011). Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* *39*, 5692–5703.
- Gao, C., Frausto, S.F., Guedea, A.L., Tronson, N.C., Jovasevic, V., Leaderbrand, K., Corcoran, K.A., Guzmán, Y.F., Swanson, G.T., and Radulovic, J. (2011). IQGAP1 regulates NR2A signaling, spine density, and cognitive processes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 8533–8542.
- Gao, J., Wang, W.-Y., Mao, Y.-W., Gräff, J., Guan, J.-S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., and Tsai, L.-H. (2010). A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* *466*, 1105–1109.
- Gao, Y., Su, J., Guo, W., Polich, E.D., Magyar, D.P., Xing, Y., Li, H., Smrt, R.D., Chang, Q., and Zhao, X. (2015). Inhibition of miR-15a Promotes BDNF Expression and Rescues Dendritic Maturation Deficits in MeCP2-Deficient Neurons. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 1618–1629.
- Garaffo, G., Conte, D., Provero, P., Tomaiuolo, D., Luo, Z., Pinciroli, P., Peano, C., D'Atri, I., Gitton, Y., Etzion, T., et al. (2015). The Dlx5 and Foxg1 transcription factors, linked via miRNA-9 and -200, are required for the development of the olfactory and GnRH system. *Mol. Cell. Neurosci.* *68*, 103–119.
- García-Romero, N., Carrión-Navarro, J., Esteban-Rubio, S., Lázaro-Ibáñez, E., Peris-Celda, M., Alonso, M.M., Guzmán-De-Villoria, J., Fernández-Carballal, C., de Mendivil, A.O., García-Duque, S., et al. (2017). DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget* *8*, 1416–1428.
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C.B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavík, J., Machala, M., and Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat. Commun.* *5*, 3477.

Bibliographie

- Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1143–1149.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* *312*, 75–79.
- Giusti, S.A., Vogl, A.M., Brockmann, M.M., Vercelli, C.A., Rein, M.L., Trümbach, D., Wurst, W., Cazalla, D., Stein, V., Deussing, J.M., et al. (2014). MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *ELife* *3*.
- Glebov, K., Löchner, M., Jabs, R., Lau, T., Merkel, O., Schloss, P., Steinhäuser, C., and Walter, J. (2015). Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia* *63*, 626–634.
- Goldie, B.J., Dun, M.D., Lin, M., Smith, N.D., Verrills, N.M., Dayas, C.V., and Cairns, M.J. (2014). Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic Acids Res.* *42*, 9195–9208.
- Gong, J., Körner, R., Gaitanos, L., and Klein, R. (2016). Exosomes mediate cell contact-independent ephrin-Eph signaling during axon guidance. *J. Cell Biol.* *214*, 35–44.
- Grant, B.D., and Donaldson, J.G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 597–608.
- Greening, D.W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B.J., and Simpson, R.J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1295*, 179–209.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235–240.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* *32*, D109–111.
- Griffiths-Jones, S. (2006). miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *342*, 129–138.
- Griffiths-Jones, S. (2010). miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr. Protoc. Bioinforma. Chapter 12*, Unit 12.9.1–10.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* *34*, D140–144.
- Griffiths-Jones, S., Hui, J.H.L., Marco, A., and Ronshaugen, M. (2011). MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Rep.* *12*, 172–177.
- Griggs, E.M., Young, E.J., Rumbaugh, G., and Miller, C.A. (2013). MicroRNA-182 regulates amygdala-dependent memory formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 1734–1740.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engle, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* *27*, 91–105.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23–34.

Bibliographie

- Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1036–1045.
- Gu, Q.-H., Yu, D., Hu, Z., Liu, X., Yang, Y., Luo, Y., Zhu, J., and Li, Z. (2015). miR-26a and miR-384-5p are required for LTP maintenance and spine enlargement. *Nat. Commun.* *6*, 6789.
- Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., and Agnati, L.F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *117*, 1–4.
- Guo, L., and Chen, F. (2014). A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene* *544*, 1–7.
- Guo, J., Wang, H., Wang, Q., Chen, Y., and Chen, S. (2014). Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *7*, 1297–1306.
- Guo, L., Zhao, Y., Zhang, H., Yang, S., and Chen, F. (2013). Close association between paralogous multiple isomiRs and paralogous/orthologues miRNA sequences implicates dominant sequence selection across various animal species. *Gene* *527*, 624–629.
- Ha, D., Yang, N., and Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm. Sin. B* *6*, 287–296.
- Hackenberg, M., Sturm, M., Langenberger, D., Falcón-Pérez, J.M., and Aransay, A.M. (2009). miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.* *37*, W68-76.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A.-C., Munschauer, M., et al. (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* *141*, 129–141.
- Hammond, S.M. (2005). Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* *579*, 5822–5829.
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H., Yang, W.-Y., Haussler, D., Billech, R., and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* *136*, 75–84.
- Hancock, M.L., Preitner, N., Quan, J., and Flanagan, J.G. (2014). MicroRNA-132 is enriched in developing axons, locally regulates Rasal mRNA, and promotes axon extension. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 66–78.
- Hansen, K.F., Sakamoto, K., Wayman, G.A., Impey, S., and Obrietan, K. (2010). Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PLoS One* *5*, e15497.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* *495*, 384–388.
- Hansen, T.B., Venø, M.T., Jensen, T.I., Schaefer, A., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2016). Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat. Commun.* *7*, 11538.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* *97*, 329–339.
- Havens, M.A., Reich, A.A., Duelli, D.M., and Hastings, M.L. (2012). Biogenesis of mammalian

Bibliographie

- microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4626–4640.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* *6*, 986–994.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* *94*, 3791–3799.
- Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G., and Choquet, D. (2008). Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neurologin contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20947.
- Hendrix, D., Levine, M., and Shi, W. (2010). miRTRAP, a computational method for the systematic identification of miRNAs from high throughput sequencing data. *Genome Biol.* *11*, R39.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* *27*, 3300–3310.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev. Cell* *21*, 77–91.
- Herculano-Houzel, S., Avelino-de-Souza, K., Neves, K., Porfirio, J., Messeder, D., Mattos Feijó, L., Maldonado, J., and Manger, P.R. (2014). The elephant brain in numbers. *Front. Neuroanat.* *8*, 46.
- Hernandez-Rapp, J., Smith, P.Y., Filali, M., Goupil, C., Planel, E., Magill, S.T., Goodman, R.H., and Hébert, S.S. (2015). Memory formation and retention are affected in adult miR-132/212 knockout mice. *Behav. Brain Res.* *287*, 15–26.
- Hess, C., Sadallah, S., Hefti, A., Landmann, R., and Schifferli, J.A. (1999). Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 4564–4573.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* *83*, 8604–8610.
- Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, I.K., Hindson, B.J., Vessella, R.L., and Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* *10*, 1003–1005.
- Ho, V.M., Dallalzadeh, L.O., Karathanasis, N., Keles, M.F., Vangala, S., Grogan, T., Poirazi, P., and Martin, K.C. (2014). GluA2 mRNA distribution and regulation by miR-124 in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *61*, 1–12.
- Hobert, O. (2007). miRNAs play a tune. *Cell* *131*, 22–24.
- Hochbaum, D.R., Zhao, Y., Farhi, S.L., Klapoetke, N., Werley, C.A., Kapoor, V., Zou, P., Kralj, J.M., Maclaurin, D., Smedemark-Margulies, N., et al. (2014). All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat. Methods* *11*, 825–833.
- Hoehn, R.S., Jernigan, P.L., Chang, A.L., Edwards, M.J., Caldwell, C.C., Gulbins, E., and Pritts, T.A. (2016). Acid Sphingomyelinase Inhibition Prevents Hemolysis During Erythrocyte Storage. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *39*, 331–340.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*, 31–108.

Bibliographie

- Holt, C.E., and Schuman, E.M. (2013). The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron* 80, 648–657.
- Hombach, S., and Kretz, M. (2016). Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv. Exp. Med. Biol.* 937, 3–17.
- Hornstein, E., Mansfield, J.H., Yekta, S., Hu, J.K.-H., Harfe, B.D., McManus, M.T., Baskerville, S., Bartel, D.P., and Tabin, C.J. (2005). The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development. *Nature* 438, 671–674.
- Hoshina, S., Sekizuka, T., Kataoka, M., Hasegawa, H., Hamada, H., Kuroda, M., and Katano, H. (2016). Profile of Exosomal and Intracellular microRNA in Gamma-Herpesvirus-Infected Lymphoma Cell Lines. *PloS One* 11, e0162574.
- Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M.J., and Weaver, A.M. (2013). Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep.* 5, 1159–1168.
- Hou, Q., Ruan, H., Gilbert, J., Wang, G., Ma, Q., Yao, W.-D., and Man, H.-Y. (2015). MicroRNA miR124 is required for the expression of homeostatic synaptic plasticity. *Nat. Commun.* 6, 10045.
- Howitt, J., and Hill, A.F. (2016). Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *J. Biol. Chem.* 291, 26589–26597.
- Hristovska, I., and Pascual, O. (2015). Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Front. Integr. Neurosci.* 9, 73.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S.-I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J., et al. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* 189, 223–232.
- Hu, Z., and Li, Z. (2017). miRNAs in synapse development and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45, 24–31.
- Hu, Z., Yu, D., Gu, Q., Yang, Y., Tu, K., Zhu, J., and Li, Z. (2014). miR-191 and miR-135 are required for long-lasting spine remodelling associated with synaptic long-term depression. *Nat. Commun.* 5, 3263.
- Hu, Z., Zhao, J., Hu, T., Luo, Y., Zhu, J., and Li, Z. (2015). miR-501-3p mediates the activity-dependent regulation of the expression of AMPA receptor subunit GluA1. *J. Cell Biol.* 208, 949–959.
- Huang, W. (2017). MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1617, 57–67.
- Huang, J., Liang, Z., Yang, B., Tian, H., Ma, J., and Zhang, H. (2007). Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J. Biol. Chem.* 282, 33632–33640.
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R.L., Liu, Y., Liang, M., et al. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 14, 319.
- Huang, Y., Guo, J., Wang, Q., and Chen, Y. (2014). MicroRNA-132 silencing decreases the spontaneous recurrent seizures. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 1639–1649.
- Huang, Y.-W.A., Ruiz, C.R., Eyler, E.C.H., Lin, K., and Meffert, M.K. (2012). Dual regulation of

Bibliographie

- miRNA biogenesis generates target specificity in neurotrophin-induced protein synthesis. *Cell* *148*, 933–946.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16961–16966.
- Hung, M.E., and Leonard, J.N. (2015). Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation. *J. Biol. Chem.* *290*, 8166–8172.
- Hurley, J.H., and Hanson, P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 556–566.
- Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 22–32.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* *297*, 2056–2060.
- Hwang, H.-W., Wentzel, E.A., and Mendell, J.T. (2007). A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* *315*, 97–100.
- Hwang, H.-W., Wentzel, E.A., and Mendell, J.T. (2009). Cell-cell contact globally activates microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 7016–7021.
- Hyenne, V., Apaydin, A., Rodriguez, D., Spiegelhalter, C., Hoff-Yoessle, S., Diem, M., Tak, S., Lefebvre, O., Schwab, Y., Goetz, J.G., et al. (2015). RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J. Cell Biol.* *211*, 27–37.
- Im, H.-I., and Kenny, P.J. (2012). MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci.* *35*, 325–334.
- Im, H.-I., Hollander, J.A., Bali, P., and Kenny, P.J. (2010). MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat. Neurosci.* *13*, 1120–1127.
- Impey, S., Davare, M., Lesiak, A., Lasiek, A., Fortin, D., Ando, H., Varlamova, O., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., et al. (2010). An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* *43*, 146–156.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* *431*, 931–945.
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T.D., Tridandapani, S., et al. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* *121*, 984–995.
- Iwasaki, S., and Tomari, Y. (2009). Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly (Austin)* *3*, 204–206.
- Jaafari, N., Henley, J.M., and Hanley, J.G. (2012). PICK1 mediates transient synaptic expression of GluA2-lacking AMPA receptors during glycine-induced AMPA receptor trafficking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 11618–11630.
- Jackson, A., and Linsley, P.S. (2010). The therapeutic potential of microRNA modulation. *Discov. Med.* *9*, 311–318.

Bibliographie

- Janas, T., Janas, T., and Yarus, M. (2006). Specific RNA binding to ordered phospholipid bilayers. *Nucleic Acids Res.* *34*, 2128–2136.
- Janas, T., Janas, M.M., Sapoń, K., and Janas, T. (2015). Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Lett.* *589*, 1391–1398.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1685–1694.
- Jaskiewicz, L., and Filipowicz, W. (2008). Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *320*, 77–97.
- Jimenez-Mateos, E.M., Engel, T., Merino-Serrais, P., McKiernan, R.C., Tanaka, K., Mouri, G., Sano, T., O'Tuathaigh, C., Waddington, J.L., Prenter, S., et al. (2012). Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat. Med.* *18*, 1087–1094.
- Jin, P., Alisch, R.S., and Warren, S.T. (2004). RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1048–1053.
- Jinek, M., and Doudna, J.A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* *457*, 405–412.
- John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* *2*, e363.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* *262*, 9412–9420.
- Jovičić, A., and Gitler, A.D. (2017). Distinct repertoires of microRNAs present in mouse astrocytes compared to astrocyte-secreted exosomes. *PLoS One* *12*, e0171418.
- Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Garner, C.C., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., and Malenka, R.C. (2004). Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* *7*, 244–253.
- Juhila, J., Sipilä, T., Icaý, K., Nicorici, D., Ellonen, P., Kallio, A., Korpelainen, E., Greco, D., and Hovatta, I. (2011). MicroRNA expression profiling reveals miRNA families regulating specific biological pathways in mouse frontal cortex and hippocampus. *PLoS One* *6*, e21495.
- Kadener, S., Rodriguez, J., Abruzzi, K.C., Khodor, Y.L., Sugino, K., Marr, M.T., Nelson, S., and Rosbash, M. (2009). Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex. *RNA N. Y. N* *15*, 537–545.
- Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., and Nakamura, S. (2013). Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat. Commun.* *4*, 2712.
- Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borràs, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., et al. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* *10*, e1001450.
- Kandel, E.R., and Spencer, W.A. (1968). Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiol. Rev.* *48*, 65–134.
- Kang, H., and Schuman, E.M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-

induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273, 1402–1406.

Kanno, T., Nishizaki, T., Proia, R.L., Kajimoto, T., Jahangeer, S., Okada, T., and Nakamura, S. (2010). Regulation of synaptic strength by sphingosine 1-phosphate in the hippocampus. *Neuroscience* 171, 973–980.

Kao, H.T., Porton, B., Hilfiker, S., Stefani, G., Pieribone, V.A., DeSalle, R., and Greengard, P. (1999). Molecular evolution of the synapsin gene family. *J. Exp. Zool.* 285, 360–377.

Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., et al. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 96, 111–115.

Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., and Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev. Cell* 4, 205–217.

Katakowski, M., Zheng, X., Jiang, F., Rogers, T., Szalad, A., and Chopp, M. (2010). MiR-146b-5p suppresses EGFR expression and reduces in vitro migration and invasion of glioma. *Cancer Invest.* 28, 1024–1030.

Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S.-I., Baba, T., and Suzuki, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.* 23, 433–438.

Kawamata, T., and Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends Biochem. Sci.* 35, 368–376.

Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., et al. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.* 428, 688–692.

Kempf, S.J., Buratovic, S., von Toerne, C., Moertl, S., Stenerlöw, B., Hauck, S.M., Atkinson, M.J., Eriksson, P., and Tapio, S. (2014). Ionising radiation immediately impairs synaptic plasticity-associated cytoskeletal signalling pathways in HT22 cells and in mouse brain: an in vitro/in vivo comparison study. *PloS One* 9, e110464.

Kenny, P.J., Zhou, H., Kim, M., Skariah, G., Khetani, R.S., Drnevich, J., Arcila, M.L., Kosik, K.S., and Ceman, S. (2014). MOV10 and FMRP regulate AGO2 association with microRNA recognition elements. *Cell Rep.* 9, 1729–1741.

Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.

Khvorova, A., Kwak, Y.G., Tamkun, M., Majerfeld, I., and Yarus, M. (1999). RNAs that bind and change the permeability of phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10649–10654.

Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.

Kim, V.N. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells* 19, 1–15.

Kim, D.-K., Kang, B., Kim, O.Y., Choi, D.-S., Lee, J., Kim, S.R., Go, G., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Jang, S.C., et al. (2013). EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 2.

Kim, D.-K., Lee, J., Kim, S.R., Choi, D.-S., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Go, G., Nhung, D., Hong, K.,

Bibliographie

- Jang, S.C., et al. (2015a). EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *31*, 933–939.
- Kim, H.H., Kim, P., Phay, M., and Yoo, S. (2015b). Identification of precursor microRNAs within distal axons of sensory neuron. *J. Neurochem.* *134*, 193–199.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M., and Ruvkun, G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 360–365.
- Kim, K.M., Abdelmohsen, K., Mustapic, M., Kapogiannis, D., and Gorospe, M. (2017). RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *8*.
- Kim, M.S., Oh, J.E., Kim, Y.R., Park, S.W., Kang, M.R., Kim, S.S., Ahn, C.H., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2010). Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers. *J. Pathol.* *221*, 139–146.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126–139.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* *129*, 1141–1151.
- Klein, R., and Kania, A. (2014). Ephrin signalling in the developing nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* *27*, 16–24.
- Klein, M.E., Lioy, D.T., Ma, L., Impey, S., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2007). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat. Neurosci.* *10*, 1513–1514.
- Kloosterman, W.P., Wienholds, E., Ketting, R.F., and Plasterk, R.H.A. (2004). Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res.* *32*, 6284–6291.
- Kocerha, J., Faghihi, M.A., Lopez-Toledano, M.A., Huang, J., Ramsey, A.J., Caron, M.G., Sales, N., Willoughby, D., Elmen, J., Hansen, H.F., et al. (2009). MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3507–3512.
- Koles, K., Nunnari, J., Korkut, C., Barria, R., Brewer, C., Li, Y., Leszyk, J., Zhang, B., and Budnik, V. (2012). Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *J. Biol. Chem.* *287*, 16820–16834.
- Kong, Y.W., Cannell, I.G., de Moor, C.H., Hill, K., Garside, P.G., Hamilton, T.L., Meijer, H.A., Dobbryn, H.C., Stoneley, M., Spriggs, K.A., et al. (2008). The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8866–8871.
- Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J.R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., et al. (2010). MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 14835–14842.
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A.J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X., et al. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* *8*, 1649–1658.
- Korkut, C., Ataman, B., Ramachandran, P., Ashley, J., Barria, R., Gherbesi, N., and Budnik, V. (2009). Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* *139*, 393–

404.

Korkut, C., Li, Y., Koles, K., Brewer, C., Ashley, J., Yoshihara, M., and Budnik, V. (2013). Regulation of postsynaptic retrograde signaling by presynaptic exosome release. *Neuron* 77, 1039–1046.

Kos, A., Olde Loohuis, N., Meinhardt, J., van Bokhoven, H., Kaplan, B.B., Martens, G.J., and Aschrafi, A. (2016). MicroRNA-181 promotes synaptogenesis and attenuates axonal outgrowth in cortical neurons. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 3555–3567.

Kos, A., Klein-Gunnewiek, T., Meinhardt, J., Loohuis, N.F.M.O., van Bokhoven, H., Kaplan, B.B., Martens, G.J., Kolk, S.M., and Aschrafi, A. (2017). MicroRNA-338 Attenuates Cortical Neuronal Outgrowth by Modulating the Expression of Axon Guidance Genes. *Mol. Neurobiol.* 54, 3439–3452.

Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., and Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442–17452.

Kowal, J., Tkach, M., and Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 116–125.

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdahl-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E968-977.

Krämer-Albers, E.-M., and Hill, A.F. (2016). Extracellular vesicles: interneural shuttles of complex messages. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 101–107.

Krämer-Albers, E.-M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K.-A., Schild, H., and Trotter, J. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin. Appl.* 1, 1446–1461.

Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500.

Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010a). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.

Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M.B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H.J., Schübeler, D., et al. (2010b). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* 141, 618–631.

Kügler, S., Kilic, E., and Bähr, M. (2003). Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther.* 10, 337–347.

Kumari, S., Mg, S., and Mayor, S. (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 20, 256–275.

Kunadt, M., Eckermann, K., Stüendl, A., Gong, J., Russo, B., Strauss, K., Rai, S., Kügler, S., Falomir Lockhart, L., Schwalbe, M., et al. (2015). Extracellular vesicle sorting of α -Synuclein is regulated by sumoylation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 695–713.

Kwon, S.C., Nguyen, T.A., Choi, Y.-G., Jo, M.H., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.-S. (2016).

Bibliographie

Structure of Human DROSHA. *Cell* 164, 81–90.

Kye, M.J., Neveu, P., Lee, Y.-S., Zhou, M., Steen, J.A., Sahin, M., Kosik, K.S., and Silva, A.J. (2011). NMDA mediated contextual conditioning changes miRNA expression. *PLoS One* 6, e24682.

Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., and Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 409–418.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol. CB* 12, 735–739.

Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* 30, 363–364.

Lai, X., and Friedman, A. (2017). Exosomal microRNA concentrations in colorectal cancer: A mathematical model. *J. Theor. Biol.* 415, 70–83.

Lai, E.C., Tomancak, P., Williams, R.W., and Rubin, G.M. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol.* 4, R42.

Lal, A., Navarro, F., Maher, C.A., Maliszewski, L.E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D.M., Tsai, P., Hofmann, O., et al. (2009). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to “seedless” 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol. Cell* 35, 610–625.

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401–1414.

Lane, R.E., Korbie, D., Trau, M., and Hill, M.M. (2017). Purification Protocols for Extracellular Vesicles. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1660, 111–130.

Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., and Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198–201.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862.

Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., et al. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* 380, 161–171.

Laulagnier, K., Vincent-Schneider, H., Hamdi, S., Subra, C., Lankar, D., and Record, M. (2005). Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 116–121.

Laulagnier, K., Javalet, C., Hemming, F.J., and Sadoul, R. (2017). Purification and Analysis of Exosomes Released by Mature Cortical Neurons Following Synaptic Activation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1545, 129–138.

Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864.

Bibliographie

- Lee, E.J., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D.J., Nuovo, G.J., and Schmittgen, T.D. (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA N. Y. N* 14, 35–42.
- Lee, K., Kim, J.-H., Kwon, O.-B., An, K., Ryu, J., Cho, K., Suh, Y.-H., and Kim, H.-S. (2012). An activity-regulated microRNA, miR-188, controls dendritic plasticity and synaptic transmission by downregulating neuropilin-2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 5678–5687.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663–4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532.
- Lee, Y.S., Pressman, S., Andress, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim, D.H., Cho, I.S., et al. (2009). Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat. Cell Biol.* 11, 1150–1156.
- Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512–517.
- Lesiak, A., Zhu, M., Chen, H., Appleyard, S.M., Impey, S., Lein, P.J., and Wayman, G.A. (2014). The environmental neurotoxicant PCB 95 promotes synaptogenesis via ryanodine receptor-dependent miR132 upregulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 717–725.
- Leung, A.K.L., Calabrese, J.M., and Sharp, P.A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18125–18130.
- Lewis, B.P., Shih, I.-hun., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787–798.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Li, B., and Sun, H. (2013). MiR-26a promotes neurite outgrowth by repressing PTEN expression. *Mol. Med. Rep.* 8, 676–680.
- Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C.-Y., and Zen, K. (2012a). Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One* 7, e46957.
- Li, S.-C., Liao, Y.-L., Ho, M.-R., Tsai, K.-W., Lai, C.-H., and Lin, W. (2012b). miRNA arm selection and isomiR distribution in gastric cancer. *BMC Genomics* 13 Suppl 1, S13.
- Licatalosi, D.D., Mele, A., Fak, J.J., Ule, J., Kayikci, M., Chi, S.W., Clark, T.A., Schweitzer, A.C.,

Bibliographie

- Blume, J.E., Wang, X., et al. (2008). HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* 456, 464–469.
- Liddell, E.G. (1956). Cajal and Sherrington. *Lect. Sci. Basis Med. Vol. 6*, 100–115.
- Lim, Y.-J., and Lee, S.-J. (2017). Are exosomes the vehicle for protein aggregate propagation in neurodegenerative diseases? *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 64.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003a). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 17, 991–1008.
- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003b). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773.
- Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714–725.
- Lin, Q., Wei, W., Coelho, C.M., Li, X., Baker-Andresen, D., Dudley, K., Ratnu, V.S., Boskovic, Z., Kobor, M.S., Sun, Y.E., et al. (2011). The brain-specific microRNA miR-128b regulates the formation of fear-extinction memory. *Nat. Neurosci.* 14, 1115–1117.
- Lippi, G., Steinert, J.R., Marczylo, E.L., D’Oro, S., Fiore, R., Forsythe, I.D., Schrott, G., Zoli, M., Nicotera, P., and Young, K.W. (2011). Targeting of the Arpc3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. *J. Cell Biol.* 194, 889–904.
- Liu, C.-G., Calin, G.A., Volinia, S., and Croce, C.M. (2008). MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat. Protoc.* 3, 563–578.
- Liu, C.-M., Wang, R.-Y., Saijilafu, null, Jiao, Z.-X., Zhang, B.-Y., and Zhou, F.-Q. (2013). MicroRNA-138 and SIRT1 form a mutual negative feedback loop to regulate mammalian axon regeneration. *Genes Dev.* 27, 1473–1483.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441.
- Liu, S., Hossinger, A., Göbbels, S., and Vorberg, I.M. (2017). Prions on the run: How extracellular vesicles serve as delivery vehicles for self-templating protein aggregates. *Prion* 11, 98–112.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297, 2053–2056.
- Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., and Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1302–1309.
- Lobb, R.J., Becker, M., Wen, S.W., Wong, C.S.F., Wiegmanns, A.P., Leimgruber, A., and Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles* 4, 27031.
- Lötvall, J., Hill, A.F., Hochberg, F., Buzás, E.I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y.S., Kurochkin, I.V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., et al. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International

Bibliographie

- Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3, 26913.
- Loya, C.M., McNeill, E.M., Bao, H., Zhang, B., and Van Vactor, D. (2014). miR-8 controls synapse structure by repression of the actin regulator enabled. *Dev. Camb. Engl.* 141, 1864–1874.
- Lu, C.S., Zhai, B., Mauss, A., Landgraf, M., Gygi, S., and Van Vactor, D. (2014). MicroRNA-8 promotes robust motor axon targeting by coordinate regulation of cell adhesion molecules during synapse development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369.
- Lugli, G., Larson, J., Martone, M.E., Jones, Y., and Smalheiser, N.R. (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J. Neurochem.* 94, 896–905.
- Lugli, G., Torvik, V.I., Larson, J., and Smalheiser, N.R. (2008). Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J. Neurochem.* 106, 650–661.
- Lugli, G., Larson, J., Demars, M.P., and Smalheiser, N.R. (2012). Primary microRNA precursor transcripts are localized at post-synaptic densities in adult mouse forebrain. *J. Neurochem.* 123, 459–466.
- Lujambio, A., and Esteller, M. (2009). How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 377–382.
- Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., et al. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13556–13561.
- Lunavat, T.R., Cheng, L., Kim, D.-K., Bhadury, J., Jang, S.C., Lässer, C., Sharples, R.A., López, M.D., Nilsson, J., Ghosh, Y.S., et al. (2015). Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells—Evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol.* 12, 810–823.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Lynch, G., and Baudry, M. (1987). Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res. Bull.* 18, 809–815.
- Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9667–9672.
- Maas, S.L.N., Breakefield, X.O., and Weaver, A.M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 27, 172–188.
- Maienschein, V., Marxen, M., Volkandt, W., and Zimmermann, H. (1999). A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* 26, 233–244.
- Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999). Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285, 1870–1874.
- Malik, R., and Marchese, A. (2010). Arrestin-2 interacts with the endosomal sorting complex required for transport machinery to modulate endosomal sorting of CXCR4. *Mol. Biol. Cell* 21, 2529–2541.
- Malmqvist, J., Petri, R., Knauff, P., Brattås, P.L., Åkerblom, M., and Jakobsson, J. (2016). Distinct

Bibliographie

cognitive effects and underlying transcriptome changes upon inhibition of individual miRNAs in hippocampal neurons. *Sci. Rep.* *6*, 19879.

Mani, S.R., and Juliano, C.E. (2013). Untangling the web: the diverse functions of the PIWI/piRNA pathway. *Mol. Reprod. Dev.* *80*, 632–664.

Mannironi, C., Biundo, A., Rajendran, S., De Vito, F., Saba, L., Caioli, S., Zona, C., Ciotti, T., Caristi, S., Perlas, E., et al. (2017). miR-135a Regulates Synaptic Transmission and Anxiety-Like Behavior in Amygdala. *Mol. Neurobiol.*

Marler, K.J., Suetterlin, P., Dopplapudi, A., Rubikaite, A., Adnan, J., Maiorano, N.A., Lowe, A.S., Thompson, I.D., Pathania, M., Bordey, A., et al. (2014). BDNF promotes axon branching of retinal ganglion cells via miRNA-132 and p250GAP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 969–979.

Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1102–1107.

Marsico, A., Huska, M.R., Lasserre, J., Hu, H., Vucicevic, D., Musahl, A., Orom, U., and Vingron, M. (2013). PROMiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs. *Genome Biol.* *14*, R84.

Marzesco, A.-M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., and Huttner, W.B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.* *118*, 2849–2858.

Mathelier, A., and Carbone, A. (2010). MIRENA: finding microRNAs with high accuracy and no learning at genome scale and from deep sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *26*, 2226–2234.

Mathivanan, S., and Simpson, R.J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* *9*, 4997–5000.

Mathivanan, S., Lim, J.W.E., Tauro, B.J., Ji, H., Moritz, R.L., and Simpson, R.J. (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 MCP* *9*, 197–208.

Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* *317*, 1764–1767.

Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., et al. (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* *303*, 531–534.

Maya-Vetencourt, J.F., and Pizzorusso, T. (2013). Molecular mechanisms at the basis of plasticity in the developing visual cortex: epigenetic processes and gene programs. *J. Exp. Neurosci.* *7*, 75–83.
Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 603–612.

McDougall, J.K., Dunn, A.R., and Jones, K.W. (1972). In situ hybridization of adenovirus RNA and DNA. *Nature* *236*, 346–348.

McKenzie, A.J., Hoshino, D., Hong, N.H., Cha, D.J., Franklin, J.L., Coffey, R.J., Patton, J.G., and Weaver, A.M. (2016). KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep.* *15*, 978–987.

Meier, C., and Dermietzel, R. (2006). Electrical synapses--gap junctions in the brain. *Results Probl.*

Bibliographie

Cell Differ. 43, 99–128.

Meijer, H.A., Smith, E.M., and Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1135–1140.

Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130, 1007S–15S.

Mellios, N., Sugihara, H., Castro, J., Banerjee, A., Le, C., Kumar, A., Crawford, B., Strathmann, J., Tropea, D., Levine, S.S., et al. (2011). miR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity. *Nat. Neurosci.* 14, 1240–1242.

Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., et al. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495, 333–338.

Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L., et al. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35, 121–133.

Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46.

Michael, M.Z., O' Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., and James, R.J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res. MCR* 1, 882–891.

Mishima, Y., Giraldez, A.J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A.F., and Inoue, K. (2006). Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr. Biol. CB* 16, 2135–2142.

Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., and Horvitz, H.R. (2004). Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 5, R68.

Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., and Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282.

Mol, E.A., Goumans, M.-J., Doevendans, P.A., Sluijter, J.P.G., and Vader, P. (2017). Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 2061–2065.

Mondal, A., Kumari Singh, D., Panda, S., and Shiras, A. (2017). Extracellular Vesicles As Modulators of Tumor Microenvironment and Disease Progression in Glioma. *Front. Oncol.* 7, 144.

Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766.

Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA N. Y. N* 16, 495–505.

Moore, R.Y. (1993). Principles of synaptic transmission. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 1–9.

Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Ng, S.K., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J., and Yang, Y. (2013). Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *J. Biol. Chem.* 288, 7105–7116.

Bibliographie

- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* *104*, 3257–3266.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* *16*, 720–728.
- Muddashetty, R.S., Nalavadi, V.C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S.T., and Bassell, G.J. (2011). Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol. Cell* *42*, 673–688.
- Mullen, T.E., and Marzluff, W.F. (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev.* *22*, 50–65.
- Munoz, J.L., Bliss, S.A., Greco, S.J., Ramkissoon, S.H., Ligon, K.L., and Rameshwar, P. (2013). Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *2*, e126.
- Muralidhar, B., Goldstein, L.D., Ng, G., Winder, D.M., Palmer, R.D., Gooding, E.L., Barbosa-Morais, N.L., Mukherjee, G., Thorne, N.P., Roberts, I., et al. (2007). Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J. Pathol.* *212*, 368–377.
- Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N., and Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 4146–4151.
- Neilsen, C.T., Goodall, G.J., and Bracken, C.P. (2012). IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet. TIG* *28*, 544–549.
- Newman, M.A., Mani, V., and Hammond, S.M. (2011). Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification. *RNA N. Y. N* *17*, 1795–1803.
- Nicholson, C., and Llinás, R. (1975). Real time current source-density analysis using multi-electrode array in cat cerebellum. *Brain Res.* *100*, 418–424.
- Niedergang, F., Gasman, S., Vitale, N., Desnos, C., and Lamaze, C. (2017). Meeting after meeting: 20 years of discoveries by the members of the Exocytosis-Endocytosis Club. *Biol. Cell* *109*, 339–353.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* *121*, 337–349.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell* *21*, 708–721.
- Nielsen, C.B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., and Burge, C.B. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA N. Y. N* *13*, 1894–1910.
- Nilsen, T.W. (2007). Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet. TIG* *23*, 243–249.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly

Bibliographie

dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.

Nolte-'t Hoen, E.N.M., Buermans, H.P.J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H.M., and 't Hoen, P.A.C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 40, 9272–9285.

Norman, E., Cutler, R.G., Flannery, R., Wang, Y., and Mattson, M.P. (2010). Plasma membrane sphingomyelin hydrolysis increases hippocampal neuron excitability by sphingosine-1-phosphate mediated mechanisms. *J. Neurochem.* 114, 430–439.

Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1108–1114.

Nudelman, A.S., DiRocco, D.P., Lambert, T.J., Garelick, M.G., Le, J., Nathanson, N.M., and Storm, D.R. (2010). Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus* 20, 492–498.

O'Brien, R.J., Kamboj, S., Ehlers, M.D., Rosen, K.R., Fischbach, G.D., and Huganir, R.L. (1998). Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron* 21, 1067–1078.

O'Carroll, D., and Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38, 39–54.

O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P.P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A.J., Miska, E.A., and Tarakhovsky, A. (2007). A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes Dev.* 21, 1999–2004.

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839–843.

Okada, T., Kajimoto, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2009). Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system. *Cell. Signal.* 21, 7–13.

Olde Loohuis, N.F.M., Ba, W., Stoerchel, P.H., Kos, A., Jager, A., Schratz, G., Martens, G.J.M., van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., and Aschrafi, A. (2015). MicroRNA-137 Controls AMPA-Receptor-Mediated Transmission and mGluR-Dependent LTD. *Cell Rep.* 11, 1876–1884.

Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N., and Biffo, S. (2017). Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J. Biol. Chem.* 8, 45–56.

Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* 216, 671–680.

Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C., and Werge, T. (2009). MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One* 4, e7225.

Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30, 460–471.

Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30; sup pp 1–13.

Paicu, C., Mohorianu, I., Stocks, M., Xu, P., Coince, A., Billmeier, M., Dalmay, T., Moulton, V., and Moxon, S. (2017). miRCat2: Accurate prediction of plant and animal microRNAs from next-

generation sequencing datasets. *Bioinforma. Oxf. Engl.*

Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., and Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* *425*, 257–263.

Palazzo, A.F., and Lee, E.S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.* *6*, 2.

Pan, B.T., and Johnstone, R.M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* *33*, 967–978.

Panatier, A., and Robitaille, R. (2012). The soothing touch: microglial contact influences neuronal excitability. *Dev. Cell* *23*, 1125–1126.

Panatier, A., Arizono, M., and Nägerl, U.V. (2014). Dissecting tripartite synapses with STED microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*, 20130597.

Paraskevopoulou, M.D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I.S., Vergoulis, T., Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2013). DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.* *41*, W169–173.

Pareek, C.S., Smoczynski, R., and Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genet.* *52*, 413–435.

Park, J.H., and Shin, C. (2017). Non-canonical targets play an important role in microRNA stability control mechanisms. *BMB Rep.* *50*, 158–159.

Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* *25*, 635–646.

Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., et al. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 34211–34222.

Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* *139*, 112–122.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* *369*, 744–747.

Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E197–205.

Pasquet, J.M., Dachary-Prigent, J., and Nurden, A.T. (1996). Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur. J. Biochem.* *239*, 647–654.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86–89.

Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 7817–7830.

Patel, M.M., and Patel, B.M. (2017). Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs* *31*, 109–133.

Bibliographie

- Patel, B., Patel, J., Cho, J.-H., Manne, S., Bonala, S., Henske, E., Roegiers, F., Markiewski, M., and Karbowiczek, M. (2016). Exosomes mediate the acquisition of the disease phenotypes by cells with normal genome in tuberous sclerosis complex. *Oncogene* *35*, 3027–3036.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A.J., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Würdinger, T., and Middeldorp, J.M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 6328–6333.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* *18*, 883–891.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* *55*, 1251–1262.
- Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* *32*, 421–431.
- Pereda, A.E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 250–263.
- Perez-Gonzalez, R., Gauthier, S.A., Kumar, A., and Levy, E. (2012). The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *J. Biol. Chem.* *287*, 43108–43115.
- Pérez-González, R., Gauthier, S.A., Kumar, A., Saito, M., Saito, M., and Levy, E. (2017). A Method for Isolation of Extracellular Vesicles and Characterization of Exosomes from Brain Extracellular Space. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1545*, 139–151.
- Peter, M.E. (2010). Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene* *29*, 2161–2164.
- Peters, L., and Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* *26*, 611–623.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* *21*, 533–542.
- Pfeiffer, T., Avignone, E., and Nägerl, U.V. (2016). Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. *Sci. Rep.* *6*, 32422.
- Pichardo-Casas, I., Goff, L.A., Swerdel, M.R., Athie, A., Davila, J., Ramos-Brossier, M., Lapid-Volosin, M., Friedman, W.J., Hart, R.P., and Vaca, L. (2012). Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res.* *1436*, 20–33.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573–1576.
- Piwecka, M., Głażar, P., Hernandez-Miranda, L.R., Memczak, S., Wolf, S.A., Rybak-Wolf, A., Filipchuk, A., Klironomos, F., Cerda Jara, C.A., Fenske, P., et al. (2017). Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*.

Bibliographie

- de Planell-Saguer, M., and Rodicio, M.C. (2013). Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin. Biochem.* *46*, 869–878.
- Pocock, J.M., and Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* *30*, 527–535.
- van der Pol, E., Böing, A.N., Harrison, P., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* *64*, 676–705.
- Pols, M.S., and Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* *315*, 1584–1592.
- Potolicchio, I., Carven, G.J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R.J., Stern, L.J., and Santambrogio, L. (2005). Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 2237–2243.
- Power, J.D., and Schlaggar, B.L. (2017). Neural plasticity across the lifespan. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *6*.
- Pozo, K., and Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* *66*, 337–351.
- Pratt, A.J., and MacRae, I.J. (2009). The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J. Biol. Chem.* *284*, 17897–17901.
- Proux-Gillardeaux, V., Raposo, G., Irinopoulou, T., and Galli, T. (2007). Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration. *Biol. Cell* *99*, 261–271.
- Pulipparacharuvil, S., Renthal, W., Hale, C.F., Taniguchi, M., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S.J., Sikder, D., Dewey, C.M., Davis, M.M., et al. (2008). Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* *59*, 621–633.
- Pusic, K.M., Pusic, A.D., and Kraig, R.P. (2016). Environmental Enrichment Stimulates Immune Cell Secretion of Exosomes that Promote CNS Myelination and May Regulate Inflammation. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 313–325.
- Quinodoz, S., and Guttman, M. (2014). Long noncoding RNAs: an emerging link between gene regulation and nuclear organization. *Trends Cell Biol.* *24*, 651–663.
- Rajasethupathy, P., Fiumara, F., Sheridan, R., Betel, D., Puthanveetil, S.V., Russo, J.J., Sander, C., Tuschl, T., and Kandel, E. (2009). Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* *63*, 803–817.
- Rajgor, D., Fiuza, M., Parkinson, G.T., and Hanley, J.G. (2017). The PICK1 Ca(2+) sensor modulates N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor-dependent microRNA-mediated translational repression in neurons. *J. Biol. Chem.* *292*, 9774–9786.
- Rajman, M., Metge, F., Fiore, R., Khudayberdiev, S., Aksoy-Aksel, A., Bicker, S., Ruedell Reschke, C., Raoof, R., Brennan, G.P., Delanty, N., et al. (2017). A microRNA-129-5p/Rbfox crosstalk coordinates homeostatic downscaling of excitatory synapses. *EMBO J.* *36*, 1770–1787.
- Rani, S., O'Brien, K., Kelleher, F.C., Corcoran, C., Germano, S., Radomski, M.W., Crown, J., and O'Driscoll, L. (2011). Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *784*, 181–195.

Bibliographie

- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* *200*, 373–383.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* *183*, 1161–1172.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., and Desaynard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol. Biol. Cell* *8*, 2631–2645.
- Rauch, S., and Martin-Serrano, J. (2011). Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding. *J. Virol.* *85*, 3546–3556.
- Reczko, M., Maragkakis, M., Alexiou, P., Grosse, I., and Hatzigeorgiou, A.G. (2012). Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *28*, 771–776.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *403*, 901–906.
- Remenyi, J., van den Bosch, M.W.M., Palygin, O., Mistry, R.B., McKenzie, C., Macdonald, A., Hutvagner, G., Arthur, J.S.C., Frenguelli, B.G., and Pankratov, Y. (2013). miR-132/212 knockout mice reveal roles for these miRNAs in regulating cortical synaptic transmission and plasticity. *PLoS One* *8*, e62509.
- Reyes-Herrera, P.H., and Ficarra, E. (2012). One decade of development and evolution of microRNA target prediction algorithms. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *10*, 254–263.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* *110*, 513–520.
- Rial, D., Lemos, C., Pinheiro, H., Duarte, J.M., Gonçalves, F.Q., Real, J.I., Prediger, R.D., Gonçalves, N., Gomes, C.A., Canas, P.M., et al. (2015). Depression as a Glial-Based Synaptic Dysfunction. *Front. Cell. Neurosci.* *9*, 521.
- Rind, H.B., Butowt, R., and von Bartheld, C.S. (2005). Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 539–549.
- Rissland, O.S., Hong, S.-J., and Bartel, D.P. (2011). MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. *Mol. Cell* *43*, 993–1004.
- Roberts, A.P.E., Lewis, A.P., and Jopling, C.L. (2011). miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7716–7729.
- Robinson, D.G., Ding, Y., and Jiang, L. (2016). Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. *Protoplasma* *253*, 31–43.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.
- van Rooij, E., and Kauppinen, S. (2014). Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* *6*, 851–864.

Bibliographie

- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83–86.
- Rüegger, S., and Großhans, H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem. Sci.* 37, 436–446.
- Rufino-Ramos, D., Albuquerque, P.R., Carmona, V., Perfeito, R., Nobre, R.J., and Pereira de Almeida, L. (2017). Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 262, 247–258.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F.G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat. Cell Biol.* 11, 1411–1420.
- Rybak-Wolf, A., Stottmeister, C., Głażar, P., Jens, M., Pino, N., Giusti, S., Hanan, M., Behm, M., Bartok, O., Ashwal-Fluss, R., et al. (2015). Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol. Cell* 58, 870–885.
- Saba, R., Störchel, P.H., Aksoy-Aksel, A., Kepura, F., Lippi, G., Plant, T.D., and Schratt, G.M. (2012). Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Biol.* 32, 619–632.
- Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kinoshita, Y., Kondo, S., and Hirokawa, N. (1997). KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* 18, 425–438.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., and Jones, P.A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435–443.
- Sambandan, S., Akbalik, G., Kochen, L., Rinne, J., Kahlstatt, J., Glock, C., Tushev, G., Alvarez-Castelao, B., Heckel, A., and Schuman, E.M. (2017). Activity-dependent spatially localized miRNA maturation in neuronal dendrites. *Science* 355, 634–637.
- Santangelo, A., Tamanini, A., Cabrini, G., and Dehecchi, M.C. (2017). Circulating microRNAs as emerging non-invasive biomarkers for gliomas. *Ann. Transl. Med.* 5, 277.
- Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., Battistelli, C., Alonzi, T., Weisz, A., and Tripodi, M. (2016). The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep.* 17, 799–808.
- Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 20083–20090.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., and Colombo, M.I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic Cph. Den.* 6, 131–143.
- Schaefer, N., Rotermund, C., Blumrich, E.-M., Lourenco, M.V., Joshi, P., Hegemann, R.U., Jamwal, S., Ali, N., García Romero, E.M., Sharma, S., et al. (2017). The malleable brain: plasticity of neural circuits and behavior - a review from students to students. *J. Neurochem.*
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., and Stevens, B. (2013). The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61, 24–36.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.

Bibliographie

- Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T.S., and Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods San Diego Calif* 44, 31–38.
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., and Greenberg, M.E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283–289.
- Schumacher, S., and Franke, K. (2013). miR-124-regulated RhoG: A conductor of neuronal process complexity. *Small GTPases* 4, 42–46.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208.
- Scott, G.K., Mattie, M.D., Berger, C.E., Benz, S.C., and Benz, C.C. (2006). Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* 66, 1277–1281.
- Scott, H.L., Tamagnini, F., Narduzzo, K.E., Howarth, J.L., Lee, Y.-B., Wong, L.-F., Brown, M.W., Warburton, E.C., Bashir, Z.I., and Uney, J.B. (2012). MicroRNA-132 regulates recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2941–2948.
- Segal, M., Vlachos, A., and Korkotian, E. (2010). The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 16, 125–131.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev. Biol.* 243, 215–225.
- Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Véron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., and Théry, C. (2005). ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106, 216–223.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 5, R13.
- Shao, N.-Y., Hu, H.Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Li, N., Chen, W., and Khaitovich, P. (2010). Comprehensive survey of human brain microRNA by deep sequencing. *BMC Genomics* 11, 409.
- Shendure, J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1135–1145.
- Shi, J., Dong, M., Li, L., Liu, L., Luz-Madrigal, A., Tsonis, P.A., Del Rio-Tsonis, K., and Liang, C. (2015). mirPro-a novel standalone program for differential expression and variation analysis of miRNAs. *Sci. Rep.* 5, 14617.
- Shi, M., Liu, C., Cook, T.J., Bullock, K.M., Zhao, Y., Ghingina, C., Li, Y., Aro, P., Dator, R., He, C., et al. (2014). Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 639–650.
- Shinohara, Y., Yahagi, K., Kawano, M., Nishiyori, H., Kawazu, C., Suzuki, N., Manabe, R., and Hirase, H. (2011). miRNA profiling of bilateral rat hippocampal CA3 by deep sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 293–298.
- Shruti, K., Shrey, K., and Vibha, R. (2011). Micro RNAs: tiny sequences with enormous potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 445–449.
- Shu, Y., Lu, W., Liu, S.-L., Xu, N., Wang, L., Zhang, L., Zheng, Z.-H., Pang, D.-W., Wang, H.-Z., and Zhang, Z.-L. (2013). Site-specific labeling of baculovirus in an integrated microfluidic

Bibliographie

device. *Lab. Chip* *13*, 860–865.

Shurtleff, M.J., Temoche-Diaz, M.M., Karfilis, K.V., Ri, S., and Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *ELife* *5*.

Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J.L., Kane, C., et al. (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* *11*, 705–716.

Siegert, S., Seo, J., Kwon, E.J., Rudenko, A., Cho, S., Wang, W., Flood, Z., Martorell, A.J., Ericsson, M., Mungenast, A.E., et al. (2015). The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* *18*, 1008–1016.

Siemen, H., Colas, D., Heller, H.C., Brüstle, O., and Pera, R.A.R. (2011). Pumilio-2 function in the mouse nervous system. *PloS One* *6*, e25932.

Sim, S.-E., Bakes, J., and Kaang, B.-K. (2014). Neuronal activity-dependent regulation of MicroRNAs. *Mol. Cells* *37*, 511–517.

Sim, S.-E., Lim, C.-S., Kim, J.-I., Seo, D., Chun, H., Yu, N.-K., Lee, J., Kang, S.J., Ko, H.-G., Choi, J.-H., et al. (2016). The Brain-Enriched MicroRNA miR-9-3p Regulates Synaptic Plasticity and Memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 8641–8652.

Siomi, H., and Siomi, M.C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* *457*, 396–404.

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Estevés, M., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1470–1476.

Smrt, R.D., Szulwach, K.E., Pfeiffer, R.L., Li, X., Guo, W., Pathania, M., Teng, Z.-Q., Luo, Y., Peng, J., Bordey, A., et al. (2010). MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1. *Stem Cells Dayt. Ohio* *28*, 1060–1070.

Sosanya, N.M., Huang, P.P.C., Cacheaux, L.P., Chen, C.J., Nguyen, K., Perrone-Bizzozero, N.I., and Raab-Graham, K.F. (2013). Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1. *J. Cell Biol.* *202*, 53–69.

Spitzer, J., Hafner, M., Landthaler, M., Ascano, M., Farazi, T., Wardle, G., Nusbaum, J., Khorshid, M., Burger, L., Zavolan, M., et al. (2014). PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation): a step-by-step protocol to the transcriptome-wide identification of binding sites of RNA-binding proteins. *Methods Enzymol.* *539*, 113–161.

Sruthi, T.V., Edatt, L., Raji, G.R., K, H., Shankar, S.S., Shankar, V., R, V., P, A., and Kumar, V.B.S. (2017). Horizontal transfer of miR-23a from hypoxic tumor cell colonies can induce angiogenesis. *J. Cell. Physiol.*

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 513–525.

Stoorvogel, W., Strous, G.J., Geuze, H.J., Oorschot, V., and Schwartz, A.L. (1991). Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* *65*, 417–427.

Störchel, P.H., Thümmeler, J., Siegel, G., Aksoy-Aksel, A., Zampa, F., Sumer, S., and Schrott, G. (2015). A large-scale functional screen identifies Noval1 and Ncoa3 as regulators of neuronal

Bibliographie

miRNA function. *EMBO J.* *34*, 2237–2254.

Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic Cph. Den.* *10*, 925–937.

Sugito, N., Ishiguro, H., Kuwabara, Y., Kimura, M., Mitsui, A., Kurehara, H., Ando, T., Mori, R., Takashima, N., Ogawa, R., et al. (2006). RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 7322–7328.

Sutton, M.A., Ito, H.T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J.C., and Schuman, E.M. (2006). Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell* *125*, 785–799.

Svensson, K.J., Christianson, H.C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L.M., Mörgelin, M., and Belting, M. (2013). Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* *288*, 17713–17724.

Tan, G.C., and Dibb, N. (2015). IsomiRs have functional importance. *Malays. J. Pathol.* *37*, 73–81.

Tan, C.L., Plotkin, J.L., Venø, M.T., von Schimmelmann, M., Feinberg, P., Mann, S., Handler, A., Kjems, J., Surmeier, D.J., O'Carroll, D., et al. (2013). MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science* *342*, 1254–1258.

Tan, G.C., Chan, E., Molnar, A., Sarkar, R., Alexieva, D., Isa, I.M., Robinson, S., Zhang, S., Ellis, P., Langford, C.F., et al. (2014). 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic Acids Res.* *42*, 9424–9435.

Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* *17*, 49–63.

Tatro, E.T., Risbrough, V., Soontornniyomkij, B., Young, J., Shumaker-Armstrong, S., Jeste, D.V., and Achim, C.L. (2013). Short-term recognition memory correlates with regional CNS expression of microRNA-138 in mice. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* *21*, 461–473.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* *455*, 1124–1128.

Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *110*, 13–21.

Taylor, D.D., and Shah, S. (2015). Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods San Diego Calif* *87*, 3–10.

Taylor, A.R., Robinson, M.B., Gifondorwa, D.J., Tytell, M., and Milligan, C.E. (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev. Neurobiol.* *67*, 1815–1829.

Terashima, A., Pelkey, K.A., Rah, J.-C., Suh, Y.H., Roche, K.W., Collingridge, G.L., McBain, C.J., and Isaac, J.T.R. (2008). An essential role for PICK1 in NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Neuron* *57*, 872–882.

Thermann, R., and Hentze, M.W. (2007). Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* *447*, 875–878.

Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena,

Bibliographie

- S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 7309–7318.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol. Chapter 3*, Unit 3.22.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 581–593.
- Thomson, J.M., Parker, J., Perou, C.M., and Hammond, S.M. (2004). A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat. Methods* *1*, 47–53.
- Tian, T., Zhu, Y.-L., Hu, F.-H., Wang, Y.-Y., Huang, N.-P., and Xiao, Z.-D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J. Cell. Physiol.* *228*, 1487–1495.
- Tian, T., Zhu, Y.-L., Zhou, Y.-Y., Liang, G.-F., Wang, Y.-Y., Hu, F.-H., and Xiao, Z.-D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J. Biol. Chem.* *289*, 22258–22267.
- Tkach, M., and Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* *164*, 1226–1232.
- Tognini, P., Putignano, E., Coatti, A., and Pizzorusso, T. (2011). Experience-dependent expression of miR-132 regulates ocular dominance plasticity. *Nat. Neurosci.* *14*, 1237–1239.
- Tolia, N.H., and Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the argonautes. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 36–43.
- Tosar, J.P., Gámbaro, F., Sanguinetti, J., Bonilla, B., Witwer, K.W., and Cayota, A. (2015). Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.* *43*, 5601–5616.
- Towler, B.P., Jones, C.I., and Newbury, S.F. (2015). Mechanisms of regulation of mature miRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 1208–1214.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* *319*, 1244–1247.
- Tran, N., and Hutvagner, G. (2013). Biogenesis and the regulation of the maturation of miRNAs. *Essays Biochem.* *54*, 17–28.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* *62*, 405–496.
- Triboulet, R., Chang, H.-M., Lapierre, R.J., and Gregory, R.I. (2009). Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *RNA N. Y. N* *15*, 1005–1011.
- Triller, A., and Choquet, D. (2008). New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* *59*, 359–374.
- Trivedi, S., and Ramakrishna, G. (2009). miRNA and neurons. *Int. J. Neurosci.* *119*, 1995–2016.
- Tsai, N.-P., Lin, Y.-L., and Wei, L.-N. (2009). MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem. J.* *424*, 411–418.

Bibliographie

- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778–783.
- Tsukahara, N. (1981). Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 4, 351–379.
- Tuck, S. (2011). Extracellular vesicles: budding regulated by a phosphatidylethanolamine translocase. *Curr. Biol. CB* 21, R988-990.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 7223–7233.
- Turrigiano, G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a005736.
- Turrigiano, G.G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135, 422–435.
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., and Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892–896.
- Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., and Geraci, F. (2014). Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306, C621-633.
- Ul-Hussain, M. (2012). Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res.* 349, 405–413.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., and Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20, 515–524.
- Varani, G., and McClain, W.H. (2000). The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep.* 1, 18–23.
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 311–330.
- Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128, 1105–1118.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934.
- Vella, L.J., Scicluna, B.J., Cheng, L., Bawden, E.G., Masters, C.L., Ang, C.-S., Williamson, N., McLean, C., Barnham, K.J., and Hill, A.F. (2017). A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue. *J. Extracell. Vesicles* 6, 1348885.
- Verderio, C., Muzio, L., Turola, E., Bergami, A., Novellino, L., Ruffini, F., Riganti, L., Corradini, I., Francolini, M., Garzetti, L., et al. (2012). Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann. Neurol.* 72, 610–624.

Bibliographie

- Verma, P., Augustine, G.J., Ammar, M.-R., Tashiro, A., and Cohen, S.M. (2015). A neuroprotective role for microRNA miR-1000 mediated by limiting glutamate excitotoxicity. *Nat. Neurosci.* *18*, 379–385.
- Vetere, G., Barbato, C., Pezzola, S., Frisone, P., Aceti, M., Ciotti, M., Cogoni, C., Ammassari-Teule, M., and Ruberti, F. (2014). Selective inhibition of miR-92 in hippocampal neurons alters contextual fear memory. *Hippocampus* *24*, 1458–1465.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* *13*, 423–433.
- Vidigal, J.A., and Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol.* *25*, 137–147.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* *4*, 2980.
- Vo, N., Klein, M.E., Varlamova, O., Keller, D.M., Yamamoto, T., Goodman, R.H., and Impey, S. (2005). A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16426–16431.
- Voellenkle, C., Rooij, J. van, Guffanti, A., Brini, E., Fasanaro, P., Isaia, E., Croft, L., David, M., Capogrossi, M.C., Moles, A., et al. (2012). Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *RNA N. Y. N* *18*, 472–484.
- Von Bartheld, C.S., and Altick, A.L. (2011). Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog. Neurobiol.* *93*, 313–340.
- van der Vos, K.E., Balaj, L., Skog, J., and Breakefield, X.O. (2011). Brain tumor microvesicles: insights into intercellular communication in the nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* *31*, 949–959.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* *21*, 1857–1862.
- Wang, X. (2008). miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA N. Y. N* *14*, 1012–1017.
- Wang, X., and El Naqa, I.M. (2008). Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *24*, 325–332.
- Wang, B., Love, T.M., Call, M.E., Doench, J.G., and Novina, C.D. (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol. Cell* *22*, 553–560.
- Wang, S., Cesca, F., Loers, G., Schweizer, M., Buck, F., Benfenati, F., Schachner, M., and Kleene, R. (2011). Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 7275–7290.
- Wang, W.-C., Lin, F.-M., Chang, W.-C., Lin, K.-Y., Huang, H.-D., and Lin, N.-S. (2009a). miRExpress: analyzing high-throughput sequencing data for profiling microRNA expression. *BMC Bioinformatics* *10*, 328.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009b). RNA-Seq: a revolutionary tool for

Bibliographie

transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 57–63.

Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K., Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P.J., Toyoda, A., et al. (2011). Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science* *332*, 848–852.

Wayman, G.A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.-Y.M., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., et al. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9093–9098.

Wehman, A.M., Poggioli, C., Schweinsberg, P., Grant, B.D., and Nance, J. (2011). The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Curr. Biol. CB* *21*, 1951–1959.

Wen, M.M. (2016). Getting miRNA Therapeutics into the Target Cells for Neurodegenerative Diseases: A Mini-Review. *Front. Mol. Neurosci.* *9*, 129.

Werner, T. (2010). Next generation sequencing in functional genomics. *Brief. Bioinform.* *11*, 499–511.

Wibrand, K., Pai, B., Siripornmongcolchai, T., Bittins, M., Berentsen, B., Ofte, M.L., Weigel, A., Skaftnesmo, K.O., and Bramham, C.R. (2012). MicroRNA regulation of the synaptic plasticity-related gene *Arc*. *PLoS One* *7*, e41688.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855–862.

Willenbrock, H., Salomon, J., Søkilde, R., Barken, K.B., Hansen, T.N., Nielsen, F.C., Møller, S., and Litman, T. (2009). Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA N. Y. N* *15*, 2028–2034.

Williamson, V., Kim, A., Xie, B., McMichael, G.O., Gao, Y., and Vladimirov, V. (2013). Detecting miRNAs in deep-sequencing data: a software performance comparison and evaluation. *Brief. Bioinform.* *14*, 36–45.

Woldemichael, B.T., Jawaid, A., Kremer, E.A., Gaur, N., Krol, J., Marchais, A., and Mansuy, I.M. (2016). The microRNA cluster miR-183/96/182 contributes to long-term memory in a protein phosphatase 1-dependent manner. *Nat. Commun.* *7*, 12594.

Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.-W., and Jung, S. (2013). Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 26.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* *7*, 297–303.

Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* *464*, 864–869.

Wong, N., and Wang, X. (2015). miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* *43*, D146-152.

Wu, L., and Belasco, J.G. (2008). Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *29*, 1–7.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc.*

Bibliographie

Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 4034–4039.

Wu, R., Su, Y., Wu, H., Dai, Y., Zhao, M., and Lu, Q. (2016). Characters, functions and clinical perspectives of long non-coding RNAs. *Mol. Genet. Genomics MGG* *291*, 1013–1033.

Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., and He, X. (2010). Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* *29*, 2302–2308.

Wu, W.-S., Tu, B.-W., Chen, T.-T., Hou, S.-W., and Tseng, J.T. (2017). CSmiRTar: Condition-Specific microRNA targets database. *PLoS One* *12*, e0181231.

Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B.A., and Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* *36*, 605–613.

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* *278*, 10963–10972.

Wyman, S.K., Knouf, E.C., Parkin, R.K., Fritz, B.R., Lin, D.W., Dennis, L.M., Krouse, M.A., Webster, P.J., and Tewari, M. (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Res.* *21*, 1450–1461.

Xiang, J., and Wu, J. (2010). Feud or Friend? The Role of the miR-17-92 Cluster in Tumorigenesis. *Curr. Genomics* *11*, 129–135.

Yagi, Y., Ohkubo, T., Kawaji, H., Machida, A., Miyata, H., Goda, S., Roy, S., Hayashizaki, Y., Suzuki, H., and Yokota, T. (2017). Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes. *Neurosci. Lett.* *636*, 48–57.

Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O'Carroll, D., and Lai, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15163–15168.

Yang, L., Zhang, R., Li, M., Wu, X., Wang, J., Huang, L., Shi, X., Li, Q., and Su, B. (2014). A functional MiR-124 binding-site polymorphism in IQGAP1 affects human cognitive performance. *PLoS One* *9*, e107065.

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* *393*, 809–812.

Yang, Y., Shu, X., Liu, D., Shang, Y., Wu, Y., Pei, L., Xu, X., Tian, Q., Zhang, J., Qian, K., et al. (2012). EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron* *73*, 774–788.

Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathioy, T., Rubin, R.L., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci.* *117*, 5567–5578.

Yao, M.-J., Chen, G., Zhao, P.-P., Lu, M.-H., Jian, J., Liu, M.-F., and Yuan, X.-B. (2012). Transcriptome analysis of microRNAs in developing cerebral cortex of rat. *BMC Genomics* *13*, 232.

Ye, B., Petritsch, C., Clark, I.E., Gavis, E.R., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2004). Nanos and Pumilio

Bibliographie

are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons. *Curr. Biol.* *CB 14*, 314–321.

Yekta, S., Shih, I.-H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* *304*, 594–596.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.

Yi, R., Pasolli, H.A., Landthaler, M., Hafner, M., Ojo, T., Sheridan, R., Sander, C., O'Carroll, D., Stoffel, M., Tuschl, T., et al. (2009). DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 498–502.

Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W., and Crabtree, G.R. (2011a). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* *476*, 228–231.

Yoo, J.-W., Irvine, D.J., Discher, D.E., and Mitragotri, S. (2011b). Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 521–535.

Yoshihara, M., Adolfsen, B., Galle, K.T., and Littleton, J.T. (2005). Retrograde signaling by Syt 4 induces presynaptic release and synapse-specific growth. *Science* *310*, 858–863.

You, X., Vlatkovic, I., Babic, A., Will, T., Epstein, I., Tushev, G., Akbalik, G., Wang, M., Glock, C., Quedenau, C., et al. (2015). Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat. Neurosci.* *18*, 603–610.

Yu, X., and Li, Z. (2016). Serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers for glioma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 1407–1410.

Zaborowski, M.P., Balaj, L., Breakefield, X.O., and Lai, C.P. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* *65*, 783–797.

Zappulli, V., Friis, K.P., Fitzpatrick, Z., Maguire, C.A., and Breakefield, X.O. (2016). Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. *J. Clin. Invest.* *126*, 1198–1207.

Zarovni, N., Corrado, A., Guazzi, P., Zocco, D., Lari, E., Radano, G., Muhhina, J., Fondelli, C., Gavrilova, J., and Chiesi, A. (2015). Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods San Diego Calif* *87*, 46–58.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA N. Y. N* *9*, 112–123.

Zeng, Y., Wagner, E.J., and Cullen, B.R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell* *9*, 1327–1333.

Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9779–9784.

Zhang, X. hui, and Poo, M. (2002). Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron* *36*, 675–688.

Zhang, B., Wang, Q., and Pan, X. (2007). MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J. Cell. Physiol.* *210*, 279–289.

Zhang, L., Zhang, S., Yao, J., Lowery, F.J., Zhang, Q., Huang, W.-C., Li, P., Li, M., Wang, X.,

Bibliographie

- Zhang, C., et al. (2015a). Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* 527, 100–104.
- Zhang, R., Huang, M., Cao, Z., Qi, J., Qiu, Z., and Chiang, L.-Y. (2015b). MeCP2 plays an analgesic role in pain transmission through regulating CREB / miR-132 pathway. *Mol. Pain* 11, 19.
- Zhang, W., Xia, W., Lv, Z., Ni, C., Xin, Y., and Yang, L. (2017). Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 41, 755–768.
- Zhu, E., Zhao, F., Xu, G., Hou, H., Zhou, L., Li, X., Sun, Z., and Wu, J. (2010). mirTools: microRNA profiling and discovery based on high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res.* 38, W392-397.
- Zhu, Y., Li, C.-S., Wang, Y.-Y., and Zhou, S.-N. (2015). Change of MicroRNA-134, CREB and p-CREB expression in epileptic rat. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 8, 292–298.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 594–600.
- Zuchero, J.B., and Barres, B.A. (2015). Glia in mammalian development and disease. *Dev. Camb. Engl.* 142, 3805–3809.
- Zuo, L., Wang, Z., Tan, Y., Chen, X., and Luo, X. (2016). piRNAs and Their Functions in the Brain. *Int. J. Hum. Genet.* 16, 53–60.