



**HAL**  
open science

# Caractérisation et fonction des vésicules extracellulaires sur le métabolisme adipocytaire : rôle du morphogène Sonic Hedgehog

Audrey Fleury

► **To cite this version:**

Audrey Fleury. Caractérisation et fonction des vésicules extracellulaires sur le métabolisme adipocytaire : rôle du morphogène Sonic Hedgehog. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT : 2015ANGE0079 . tel-02387036

**HAL Id: tel-02387036**

**<https://theses.hal.science/tel-02387036>**

Submitted on 29 Nov 2019

**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 de Doctorat

**Audrey FLEURY**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie-Santé*

**Discipline** : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

**Spécialité** : *Physiologie et Physiopathologie humaine*

**Unité de recherche** : *INSERM U1063 SOPAM : Stress oxydant et pathologies métaboliques*

**Soutenue le** 17 novembre 2015

**Thèse N°** : 77997

## **Caractérisation et fonction des vésicules extracellulaires sur le métabolisme adipocytaire : rôle du morphogène Sonic Hedgehog**

### **JURY**

Rapporteurs : **Dr Pascal PERALDI**, Chargé de recherche, CNRS UMR 7277, INSERM U1091, Nice Sophia Antipolis  
**Pr Philippe VALET**, Professeur, INSERM U1048 - I2MC, Université Toulouse III-Paul Sabatier

Président : **Pr Vincent ROHMER**, Professeur Hospitalo-Universitaire, INSERM U1063, Université-CHU Angers

Directeur de Thèse : **Dr Soazig LE LAY**, Chargée de recherche, INSERM U1063, Angers





*A Michael,  
Mes parents, mes frère et sœur,*



## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe SOPAM « Stress oxydant et Pathologies métaboliques », UMR 1063, dirigée par le Docteur Ramaroson Andriantsitohaina.

Tout d'abord, aux Docteurs Ramaroson Andriantsitohaina et Carmen Martinez, je vous remercie chaleureusement de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir accordée votre confiance tout au long de ses années.

*À ma directrice de thèse, le Docteur Soazig Le Lay, je te remercie sincèrement de m'avoir permis de réaliser cette thèse et de m'avoir encadrée et conseillée pendant ces trois années. Je te remercie également pour ta disponibilité tout au long de ce projet.*

*Aux membres de mon jury de thèse,*

Je remercie le Professeur Vincent ROHMER de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie le Docteur Pascal Péraldi et le Professeur Philippe VALET d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs.

*Aux Docteurs Martial Ruat, Hélène Faure et Lucile HOCH,*

Je vous remercie pour cette collaboration, pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eu au cours de ce projet et pour vos critiques constructives sur notre manuscrit.

*Aux membres du laboratoires SOPAM,*

Je vous remercie tous pour votre soutien, technique ou affectif, et vos encouragements,

Un immense merci à toi, Carmen, pour ta disponibilité et pour avoir partagé ton modèle et tes connaissances sur Sonic Hedgehog,

Raffaella, merci pour ta disponibilité et pour avoir partagé ton savoir-faire sur la préparation des MP ...

Sylvain, merci pour tes conseils et tes remarques constructives concernant ce manuscrit,

Merci à l'équipe « animation SOPAM » Marine, Catherine et Patricia...

Nadia, je sais toujours où te trouver, en salle de culture, merci pour nos discussions « Hedgehog » ...

Mireille, merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et pour ton soutien depuis de nombreuses années !

A mes collègues de bureau : Luisa, Sylvain, Eid et Mehdi, merci de m'avoir supportée depuis tout ce temps (Luisa et Sylvain, presque 5 ans, non ?) et promis, je vais ranger mon bureau...

Enfin, aux doctorants du laboratoire qui, pour certains, soutiendront bientôt leur thèse, Sylvain, Ousama, Eid, Edward, Samuel, Mehdi, Marine et Zainab, je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite...

# Tables des matières

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES TABLES</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS PRINCIPALES</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>1. VESICULES EXTRACELLULAIRES (VE): MEDIATEURS DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE</b>	<b>17</b>
1.1. CARACTERISTIQUES GENERALES DES VE	17
1.1.1. Les exosomes	19
1.1.2. Les microparticules (MP)	22
1.2. METHODOLOGIE POUR LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION DES VE	25
1.2.1. Isolation des VE	25
1.2.2. Marqueurs protéiques des VE	27
1.2.3. Analyse morphologique et quantification des VE	28
1.2.4. Composition moléculaire des VE	29
1.2.5. Interaction des VE avec les cellules cibles	31
1.3. PHYSIOPATHOLOGIE DES VE	33
1.3.1. VE et pathologies cardio-métaboliques	33
1.3.2. Rôle des VE dans l'immunité et les cancers	36
<b>2. LE TISSU ADIPEUX : SOURCE DE VE ?</b>	<b>39</b>
2.1. DEVELOPPEMENT DU TISSU ADIPEUX	39
2.1.1. Les différents types de TA	39
2.1.2. Répartition et hétérogénéité métabolique des dépôts de TA	41
2.1.3. Du préadipocyte à l'adipocyte : la différenciation adipocytaire	42
2.2. METABOLISME DE L'ADIPOCYTE	47
2.2.1. Fonction de stockage des lipides	47
2.2.2. Fonction de mobilisation des lipides : la lipolyse	49
2.2.3. Fonction endocrine : sécrétion d'adipokines	50
2.3. LES VE DERIVEES DU TISSU ADIPEUX	53
2.3.1. L'obésité : un contexte physiopathologique favorable à l'émission de VE	53
2.3.2. Le tissu adipeux : source de VE ?	54
<b>3. UN MORPHOGENE ASSOCIE AUX VESICULES EXTRACELLULAIRES : SONIC HEDGEHOG</b>	<b>57</b>
3.1. LA SIGNALISATION HEDGEHOG (HH)	57
3.1.1. Importance de la signalisation Hh dans les processus développementaux et l'homéostasie tissulaire	57
3.1.2. Les acteurs moléculaires de la signalisation Hh	61
3.2. REGULATION DE LA SIGNALISATION HH	69
3.2.1. Diffusion et formation du gradient de ligands Hh	69
3.2.2. Transduction du signal Hh	71
3.2.3. Agents pharmacologiques modulant la signalisation Hh : les modulateurs de Smo	73
3.3. SIGNALISATION HH ET DEVELOPPEMENT DU TISSU ADIPEUX	75
3.3.1. Contrôle de la différenciation adipocytaire par Hh	75

3.3.2. Signalisation Hh dans un tissu adipeux adulte	76
3.3.3. Signalisation Hh et plasticité du TA	77
3.3.4. Ciliopathies et obésité	77
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>	<b>79</b>
<b>CARACTERISATION DES POPULATIONS DE VESICULES EXTRACELLULAIRES LIBEREES PAR LES ADIPOCYTES</b>	<b>83</b>
BUT DU TRAVAIL	<b>83</b>
MATERIELS ET METHODES	<b>85</b>
RESULTATS	<b>91</b>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	<b>109</b>
<b>LE MORPHOGENE HH ASSOCIE AUX MICROPARTICULES INHIBE LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE VIA UNE VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG NON-CANONIQUE</b>	<b>115</b>
BUT DU TRAVAIL	<b>115</b>
RESULTATS	<b>116</b>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	<b>117</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>123</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>125</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>151</b>

# Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Libération des vésicules extracellulaires (VE) par les cellules eucaryotes.....	18
<b>Figure 2</b> : Libération d'exosomes porteurs du récepteur de la transferrine par les réticulocytes de moutons .....	19
<b>Figure 3</b> : Mécanismes cellulaires de formation et libération des exosomes.....	21
<b>Figure 4</b> : Mécanismes de formation des MP .....	24
<b>Figure 5</b> : Composition générale des vésicules extracellulaires. ....	30
<b>Figure 6</b> : Mécanismes moléculaires d'interaction entre les vésicules extracellulaires et leurs cellules cibles.....	32
<b>Figure 7</b> : Coupe histologique de tissu adipeux blanc sous-cutané murin coloré à l'hématoxyline.	39
<b>Figure 8</b> : Composition du tissu adipeux blanc. ....	40
<b>Figure 9</b> : Microscopie électronique à transmission d'une coupe de tissu adipeux brun de rat. ....	41
<b>Figure 10</b> : Lignages multiples des cellules souches mésenchymateuses et origine embryonnaire commune entre les adipocytes et les ostéoblastes.....	44
<b>Figure 11</b> : Cascade transcriptionnelle intervenant dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes.....	45
<b>Figure 12</b> : Lipogénèse <i>de novo</i> dans l'adipocyte .....	48
<b>Figure 13</b> : Voies de synthèse des TG dans l'adipocyte .....	49
<b>Figure 14</b> : Régulation de la lipolyse adipocytaire .....	50
<b>Figure 15</b> : Représentation schématique des principaux facteurs sécrétés par l'adipocyte. ....	52
<b>Figure 16</b> : Du précurseur à la protéine mature Hh sécrétée.....	58
<b>Figure 17</b> : La voie Hh intervient à divers stades au cours de l'embryogénèse .....	60
<b>Figure 18</b> : Structure du cil primaire .....	62
<b>Figure 19</b> : La signalisation Hh est intégrée au niveau du cil primaire.....	63
<b>Figure 20</b> : Structure du récepteur transmembranaire Ptch .....	63
<b>Figure 21</b> : Les co-récepteurs des morphogènes Hh.....	65
<b>Figure 22</b> : Structure du récepteur transmembranaire Smoothened .....	66
<b>Figure 23</b> : Structure des facteurs de transcription Gli. ....	67
<b>Figure 24</b> : Mécanismes de diffusion du morphogène Hh.....	71
<b>Figure 25</b> : Activation de Smo en présence des morphogènes Hh.....	72
<b>Figure 26</b> : Sites de liaison des modulateurs de Smo.....	74
<b>Figure 27</b> : Isolation des VE adipocytaires 3T3-L1 .....	90
<b>Figure 28</b> : Caractérisation morphologique et quantification des vésicules extracellulaires (VE) sécrétées par les adipocytes 3T3-L1.....	92



<b>Figure 29</b> : Caractérisation biochimique des VE sécrétées par les adipocytes 3T3-L1 sur la base de la détection de marqueurs protéiques décrits pour être associés aux VE.....	94
<b>Figure 30</b> : Caractérisation et classification des protéines identifiées à partir des différents sous-types de VE isolées d'adipocytes 3T3-L1. ....	96
<b>Figure 31</b> : Analyse par ontologie génique selon la fonction moléculaire ou le processus biologique .....	98
<b>Figure 32</b> : Identification de protéines spécifiquement enrichies dans les MP ou les exosomes.	104
<b>Figure 33</b> : Procédure expérimentale d'isolation de VE <i>ex vivo</i> .....	106
<b>Figure 34</b> : Quantification et caractérisation biochimique des VE sécrétées par les adipocytes isolés et explants de tissu adipeux de souris contrôles ( <i>ob/+</i> ) ou obèses ( <i>ob/ob</i> ) .....	108
<b>Figure 35</b> : Isolation des MP à partir d'une lignée HEK exprimant le morphogène Shh.....	121

## Liste des tables

<b>Table 1</b> : Les MP circulantes portent des antigènes de surface caractéristiques des cellules émettrices.....	28
<b>Table 2</b> : Liste des anticorps utilisés en western-blot.....	87
<b>Table 3</b> : Protéines spécifiquement enrichies dans les MP.....	100
<b>Table 4</b> : Protéines spécifiquement enrichies dans les exosomes.....	102

# Liste des abréviations principales

Les abréviations en italique sont en français

**AG** : *Acides gras*

**AMPK** : AMP-activated Protein Kinase

**APC** : Adenomatous Polyposis Coli

**Atg** : Autophagy related genes

**BMP** : Bone Morphogenetic Protein

**Boc** : Brother of CDO

**cAMP** : cyclic Adenosine Mono Phosphate

**CEBPa** : CCAAT/Enhancer-Binding Protein  $\alpha$

**CK1  $\alpha$**  : Casein Kinase 1  $\alpha$

**CMH** : *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*

**CoupTF II** : Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II

**CRD** : Cystein Rich Domain

**CXCR4** : chemokine (C-X-C motif) receptor 4

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinases

**ESCRT** : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

**FasL** : Fas Ligand

**FGF** : Fibroblast Growth Factor

**Gata 2/3** : GATA binding protein 2/3

**Gli** : Glioma associated oncogenes

**GPCR** : G-protein Coupled Receptor

**GPI** : Glycosylphosphatidylinositol

**GRK2** : G protein-coupled Receptor Kinase-2

**GSK3 $\beta$**  : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$

**Hip** : Hedgehog Interacting Protein

**hMADs** : human Multipotent Adipose-Derived stem

**HMG CoA reductase** : Hydroxy-Methyl-Glutaryl Coenzyme A reductase

**HSPG** : Heparan Sulfate Proteoglycan

**ICAM-1** : InterCellular Adhesion Molecule

**Ihh** : Indian Hedgehog

**IL-1** : *Interleukine-1*

**IMC** : *Indice de Masse Corporelle*

**KIF3A** : kinesin family member-3A

**LAMP2** : Lysosomal-associated membrane protein

**LDL** : Low Density Lipoprotein

**LepRb** : Leptin Receptor long isoform

**LKB1** : Liver Kinase Binding protein

**LPL** : Lipoprotein Lipase

**Lpp** : Lipophorin

**LPS** : lipopolyssaccharides  
**LRP5/6** : LDL receptor-related protein 5  
**MCP-1** : Monocyte Chemoattractant Protein-1  
**MetS** : Metabolic Syndrome  
**Mfge-8** : Milk fat globule epidermal growth factor-8  
**MIF** : Macrophage migration Inhibitory Factor  
**MP** : *Microparticules*  
**MSC** : Mesenchymal Stem Cells  
**MVB** : Multivesicular Bodies  
**Myf5** : Myogenic Factor 5  
**PAI-1** : Plasminogen Activator Inhibitor-1  
**PE** : PhosphatidylEthanolamines  
**PECAM** : Platelet Endothelium Adhesion Molecule-1  
**PPAR $\gamma$**  : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma  
**PRDM16** : PR DoMain containing 16  
**Pref-1** : Preadipocyte factor 1  
**PS** : PhosphatidylSérine  
**Ptch** : Patched-1  
**RBP4** : Retinol Binding Protein-4  
**RND** : Resistance Nodulation Division  
**ROCK I** : Rho-associated protein kinase-1  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**SAG** : Smoothened AGonist  
**SANT-1** : Smoothened ANTagonist 1  
**SAS** : *Syndrome d'Apnées du Sommeil*  
**Shh** : Sonic hedgehog  
**SMO** : SMOothened  
**SREBP1-c** : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c  
**SSD** : Sterol Sensing Domain  
**SUFU** : SUppressor of FUused  
**TA** : *Tissu Adipeux*  
**TF** : Tissue Factor  
**TG** : *triglycérides*  
**TGF $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
**TLR4** : Toll-like receptor 4  
**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**Tsg101** : Tumor susceptibility Gene 101  
**UCP-1** : Uncoupling Protein-1  
**VCAM** : Vascular cell adhesion protein  
**VE** : *Vésicule Extracellulaire*  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**Wnt** : MMTV integration site family members

## **Introduction**



## Avant-Propos

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre le stockage (apport de nutriments) et la dépense énergétique (activité physique, métabolisme basale et thermogénèse). Ce déséquilibre se traduit par une surcharge pondérale, due au développement de la masse grasse, ou tissu adipeux (TA), par rapport à la masse maigre de l'organisme.

Le TA occupe une place déterminante dans le contrôle de la balance énergétique puisqu'il constitue la seule réserve de l'organisme mobilisable à long terme. Pour assurer sa fonction de stockage des lipides, le tissu adipeux va se développer en modulant deux processus biologiques : la différenciation *de novo* de nouveaux adipocytes (hyperplasie) et l'accumulation de lipides dans des adipocytes préexistants (hypertrophie). Néanmoins, le TA ne se limite pas seulement à sa fonction de stockage lipidique mais présente aussi une fonction endocrine importante, illustrée par la production de facteurs sécrétés ayant des actions pléiotropes dans l'homéostasie du métabolisme énergétique. De surcroît, le développement excessif de la masse grasse est associé à un profond remodelage du TA lié à une infiltration de cellules immunitaires, un état fibrotique et une modification du profil sécrétoire des adipocytes. L'ensemble de ces modifications structurales et métaboliques conduit à l'installation d'un état inflammatoire chronique, dit de bas grade, qui favorise l'installation des complications métaboliques associées à l'obésité (diabète de type 2, dyslipidémies ou encore les pathologies cardiovasculaires). Dans ce contexte, il apparaît primordial de comprendre les mécanismes moléculaires de la communication intercellulaire entre le TA et le reste de l'organisme qui sous-tendent aux altérations cardio-métaboliques liées à l'obésité.

La communication intercellulaire chez les organismes pluricellulaires peut être médiée par des contacts intercellulaires directs ou *via* la production de molécules solubles. Au cours de ces vingt dernières d'années, une nouvelle voie de communication a émergé mettant en évidence l'existence des vésicules extracellulaires (VE) comme vecteurs d'information biologique au niveau de l'organisme entier. Ces VE, potentiellement émises par tout type cellulaire, se retrouvent dans les nombreux fluides de l'organisme (sang, lymphes, salive, larmes, urine). De part leur origine cellulaire, elles vont présenter des compositions distinctes qui vont influencer les fonctions qu'elles peuvent exercer sur leurs cellules cibles. Les diverses propriétés immunomodulatrices ou métaboliques décrites pour ces VE suggèrent qu'elles pourraient participer à l'installation ou au développement des complications métaboliques de l'obésité. Cependant, peu de données existent dans la littérature concernant la capacité des adipocytes à produire des VE et les fonctions métaboliques de ces VE potentiellement dérivées du TA.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication des VE dans la régulation du métabolisme adipocytaire, avec un double objectif. En premier lieu, nous avons caractérisé de manière quantitative et biochimique les différents types de vésicules extracellulaires produites par les adipocytes, nécessaire à l'évaluation de leur potentiel impact dans des régulations métaboliques diverses. Parallèlement, nous avons étudié un type spécifique de VE sécrétés par des lymphocytes, à savoir les microparticules (MP) portant le morphogène Sonic Hedgehog ( $MP^{Hh+}$ ), sur le métabolisme adipocytaire.

Ce travail de recherche est introduit par une description des différents types de VE et les mécanismes moléculaires de leur biogénèse. Nous décrivons par la suite les vésicules extracellulaires dans un contexte adipocytaire après avoir replacé les fonctions du tissu adipeux dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. Enfin, nous nous attacherons à décrire les voies de signalisation de la protéine Hedgehog, morphogène qui peut être véhiculé par ces vésicules extracellulaires.

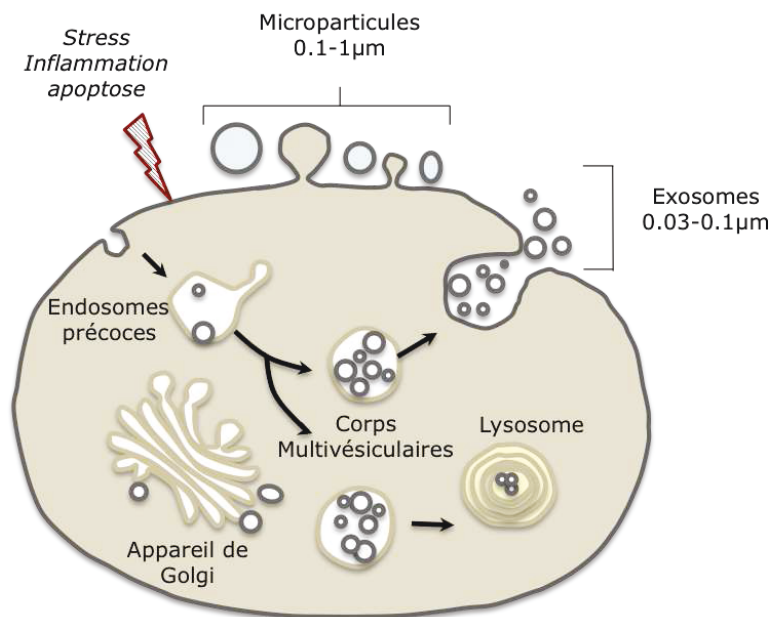
# 1. Vésicules extracellulaires (VE): médiateurs de la communication intercellulaire

La capacité des cellules à libérer des vésicules extracellulaires (VE) est un processus conservé au cours de l'évolution. Initialement découverte dans les années 80, elles ont longtemps été considérées comme de simples débris cellulaires avant que leur rôle de modulateurs dans de nombreux processus cellulaires soit révélé (pour revue (Gaceb et al., 2014; Théry et al., 2009)). La nature, l'origine cellulaire et la biogénèse de ces VE sont diverses et ont conduit à l'utilisation de différents noms pour les décrire dans la littérature. Ainsi, les terminologies microparticules, microvésicules, ectosomes ou nanovésicules ont été employées pour décrire des vésicules d'une taille comprise en 100nm et 1µm tandis que les vésicules plus petites (taille ≤ 100nm) ont reçu la dénomination de nanoparticules, exosomes ou encore « exosomes-like ». Ce champ de recherche s'est récemment structuré au travers de la création d'une société savante (« International society for extracellular vesicles ») qui a conduit à la création d'un consortium Vesiclepedia en charge de l'annotation et la nomenclature des VE (Kalra et al., 2012), de la création d'une base de données « Exocarta » regroupant les données de caractérisation de ces VE (Mathivanan et al., 2012) et enfin la création d'un journal scientifique dédié à l'étude de ces VE (International society for extracellular vesicles (Lötvall et al., 2012)). Ainsi, la nomenclature suivante (que nous utiliserons dans le reste du manuscrit) a été retenue : les corps apoptotiques (fragments cellulaires libérés en réponse à l'apoptose) regroupent de grosses vésicules (1-4µm), les microparticules (MP) définissent des vésicules dérivées de la membrane plasmique de taille comprise entre 100nm et 1µm, et les exosomes caractérisent les vésicules d'origine endo-lysosomale de très petite taille (<100nm) (pour revue (Colombo et al., 2014)).

## 1.1. Caractéristiques générales des VE

Les VE regroupent trois catégories : les exosomes, les MP et les corps apoptotiques dont le processus de libération est détaillé ci-dessous et illustré Figure 1.





**Figure 1 : Libération des vésicules extracellulaires (VE) par les cellules eucaryotes.** En fonction de l'état physiologique cellulaire, les MP sont libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique, alors que les exosomes ont une origine intracellulaire et sont libérés par fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique (Adapté de (Colombo et al., 2014)).

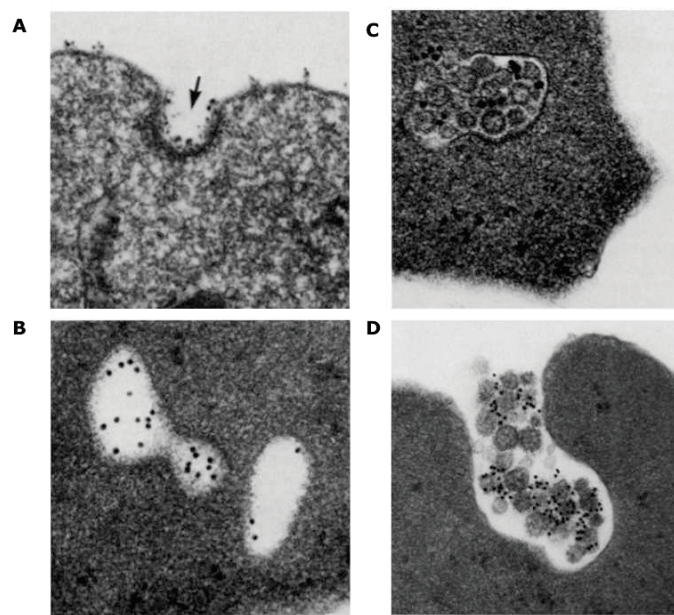
Les exosomes, représentent une population de vésicules extracellulaires d'origine intracellulaire et assez homogène en taille, comprise entre 30 et 100nm. Les exosomes proviennent des vésicules intra-luminales formées dans des endosomes tardifs ou corps multivésiculaires (CM). Les exosomes sont libérées dans le milieu extracellulaire par la fusion de ces corps multivésiculaires avec la membrane plasmique.

Les microparticules (MP) sont définies comme de petites vésicules dont la taille varie entre 0.1 et 1µm. Elles sont libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique notamment après activation cellulaire suite à une stimulation apoptotique (Figure 1). Les exosomes et les MP ont été retrouvés dans différents fluides biologiques : urine, plasma, sérum, larmes, salive dans des conditions physiologiques normales et pathologiques. Enfin, les corps apoptotiques (1-4µm) sont de grosses vésicules libérées essentiellement lors de l'apoptose cellulaire, et correspondent à des fragments cellulaires de taille hétérogène (Hristov, 2004). Leur production fait suite à une externalisation de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique cellulaire (signal apoptotique). Ils se composent majoritairement d'histones, de matériel nucléaire mais aussi de fragments d'organites cellulaires (comme du Golgi) (Thery et al., 2001a). Dans ce manuscrit nous nous intéresserons principalement aux exosomes et aux MP.

### 1.1.1. Les exosomes

#### a) Découverte

Le terme « exosome » a émergé en 1983 lors de la mise en évidence de petites vésicules (30-100nm) d'origine endosomale libérées suite à la fusion de CM avec la membrane plasmique au cours de la différenciation de réticulocytes de rat (Harding et al., 1983) et de mouton (Pan et al., 1985). Cette nouvelle voie d'exocytose a été révélée suite à l'étude du trafic intracellulaire du récepteur de la transferrine qui, après endocytose, est recyclé et se retrouve à la surface des exosomes dans le milieu extracellulaire en quelques heures (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985) (Figure 2).



**Figure 2 : Libération d'exosomes porteurs du récepteur de la transferrine par les réticulocytes de moutons.** Au cours de la différenciation des réticulocytes de mouton en érythrocytes, le récepteur de la transferrine est internalisé dans des vésicules d'endocytose (A) qui fusionnent avec les endosomes précoces (B). En quelques heures, le récepteur est détecté dans les corps multivésiculaires (CM) (C) puis secrété à la surface des exosomes grâce à la fusion des CM avec la membrane plasmique (D). L'internalisation du récepteur de la transferrine, couplé à des billes d'or, est visualisée en microscopie électronique à transmission. Figure extraite de (Pan et al., 1985).

La production d'exosomes a ensuite été mise en évidence dans plusieurs types cellulaires, particulièrement par les cellules immunitaires (lymphocytes B et T, les cellules dendritiques, les macrophages (pour revue (Théry et al., 2009)) mais aussi par les cellules épithéliales (Van Niel et al., 2001), les neurones (Fauré et al., 2006) ou encore les cellules cancéreuses (Wolfers et al., 2001). De plus, de petites vésicules contenant des protéines endosomales, et appelées exosomes, ont aussi été isolées à partir de nombreux fluides de l'organisme (sang, lymphe, urine, ascites) démontrant que les exosomes sont aussi libérés *in vivo* (pour revue (Raposo and Stoorvogel, 2013)). Néanmoins, le terme « exosome » a été largement utilisé pour définir des vésicules de

taille comprise entre 50-100 nm et/ou isolées à 100 000g, sans validation de leur origine endosomale. Par conséquent, de petites vésicules, sans certitude de leur origine endosomale, peuvent être classées parmi les exosomes (pour revue (Colombo et al., 2014)).

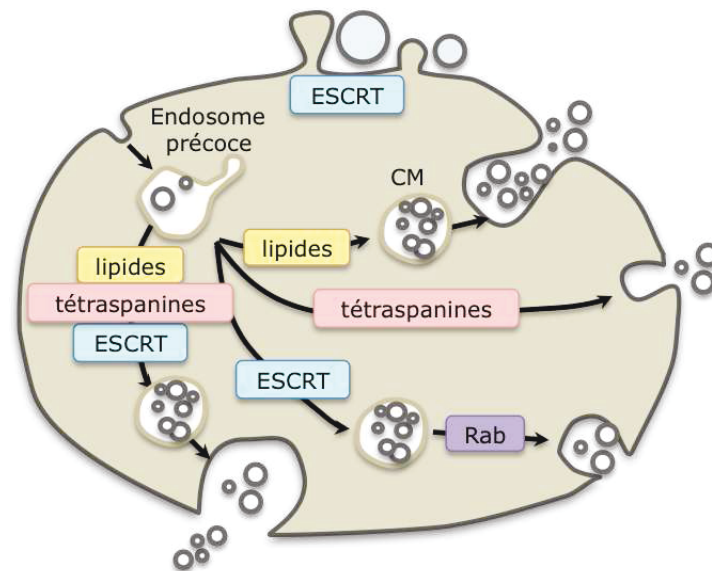
#### **b) Biogenèse des exosomes**

Au cours de l'endocytose, les vésicules internalisées fusionnent avec les endosomes précoces. Ces endosomes mûrissent en endosomes tardifs où des vésicules intra-luminales se forment dans l'espace intra-cytoplasmique. Plutôt que de fusionner avec les lysosomes, les CM fusionnent directement avec la membrane plasmique et libèrent les exosomes dans l'espace intercellulaire. Le processus de tri conduisant à la fusion des CM soit avec les lysosomes soit avec la membrane plasmique n'est pas encore totalement élucidé. Ceci suggère la co-existence de plusieurs types de CM dont la composition protéique comme la présence de marqueurs endosomaux précoces (Vidal and Stahl, 1993) ou l'état d'activation des cellules (Buschow et al., 2009) influencerait leur adressage vers la membrane plasmique. La composition en lipides, notamment un enrichissement en cholestérol, favoriserait la fusion des CM avec la membrane (Möbius et al., 2003). A l'inverse, les CM enrichis en acide lysobiphosphatidique (LBPA) seraient orientés vers les lysosomes pour dégradation (Wubbolts et al., 2003).

#### **c) Formation des corps multivésiculaires (CM)**

La formation des CM fait intervenir la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting complex Required For Transport), conservée au cours de l'évolution. Cette machinerie se compose d'environ une trentaine de protéines s'associant en quatre complexes (ESCRT 0, ESCRT I, II et III) et de protéines associées : Alix (aussi dénommée AIP-1 ou PDCD6IP), Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101) et VPS4 (Vacuolar protein sorting-associated protein 4) (pour revue (Hanson and Cashikar, 2012)) (Figure 3). Des protéines comme la clathrine ou l'Eps15 (Epidermal growth factor receptor substrate 15) interviennent aussi dans ce processus. Le complexe ESCRT-0 reconnaît et séquestre les protéines transmembranaires ubiquitinylées dans la membrane endosomale, les complexes -I, and -II seraient responsables de la déformation membranaire et de la formation des vésicules intra-luminales tandis que le complexe ESCRT-III serait impliqué dans le bourgeonnement et la scission membranaire. En particulier, Alix favorise le bourgeonnement et la scission des vésicules intra-luminales (Baietti et al., 2012) mais joue aussi un rôle dans la formation des MP (Matusek et al., 2014), ajoutant à la complexité des voies de signalisation intervenant dans la formation des exosomes et des MP (Figure 3). Cependant, la mise sous silence de gènes des complexes ESCRT, notamment *Tsg101*, n'abolit pas la formation des CM suggérant des mécanismes alternatifs participant à la

formation des CM (Stuffers et al., 2009). En particulier, deux enzymes, la sphingomyélinase neutre et la phospholipase D2, pourraient être impliquées dans ce processus étant donné que la synthèse de céramides et d'acide phosphatidique participe à la formation de vésicules intra-luminales indépendamment des protéines ESCRT (Trajkovic et al., 2008; Ghossoub et al., 2014).



**Figure 3 : Mécanismes cellulaires de formation et libération des exosomes.** Plusieurs voies interviennent dans la formation des vésicules intra-luminales des endosomes : les protéines du complexe ESCRT, les tétraspanines et certains lipides. Le complexe ESCRT est aussi décrit comme participant dans le bourgeonnement de la membrane plasmique, en particulier *via* les protéines Alix. Enfin, les GTPases Rab interviennent dans le trafic cellulaire des CM. Adapté de (Colombo et al., 2014).

#### d) Voie de sécrétion des exosomes

Les mécanismes impliqués dans la mobilisation des CM, leur fusion avec la membrane plasmique et la libération des exosomes ne sont encore totalement élucidés. L'étude de la sécrétion des exosomes en réponse à l'extinction sélective des 23 composants des complexes ESCRT *in vitro*, dans des cellules Hela, a révélé l'implication de certaines protéines ESCRT dans ce processus parmi lesquelles Tsg101 et Alix (Colombo et al., 2013). Cependant, l'implication de ces protéines dans la biogenèse exosomale et leur sécrétion semble dépendre à la fois du modèle cellulaire et des conditions d'activation cellulaire illustrant la complexité moléculaire de cette voie de sécrétion (pour revue (Colombo et al., 2014)). Enfin, ces processus requièrent aussi des protéines moteurs kinésines ou dynéines, des GTPases Rab11, 27 et 35, et les protéines de fusion SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) (pour revue (Raposo and Stoorvogel, 2013)). La sécrétion d'exosomes a majoritairement été étudiée dans des conditions basales de culture cellulaire. Néanmoins, certains stimuli cellulaires ont été décrits comme induisant une sécrétion accrue d'exosomes. C'est le cas

notamment lorsque les cellules dendritiques, les lymphocytes T ou B sont activés suite à une interaction avec des cellules T (Blanchard et al., 2002; Buschow et al., 2009; Mittelbrunn et al., 2011) ou avec le récepteur des cellules B (Muntasell et al., 2007). Dans les neurones, la dépolarisation (Fauré et al., 2006) ou une stimulation par des neurotransmetteurs (Lachenal et al., 2011) augmente aussi la sécrétion exosomale. Enfin, une mutagenèse induite par irradiation aux rayons  $\gamma$  induit la production d'exosomes par des fibroblastes ou cellules cancéreuses (Lespagnol et al., 2008; Yu et al., 2006). Malgré la mise en évidence de conditions induisant la sécrétion d'exosomes, les voies de signalisation sous-jacentes à cette libération restent à identifier.

### **1.1.2. Les microparticules (MP)**

Les MP sont des vésicules sécrétées dans le milieu extracellulaire suite au bourgeonnement de la membrane plasmique. Elles sont hétérogènes en taille qui est généralement comprise entre 100nm et 1 $\mu$ m. Leur formation a été initialement décrite lors de l'activation plaquettaire (Wolf, 1967).

#### **a) Organisation membranaire de la cellule au repos**

Chez les eucaryotes, les lipides sont distribués en phase lamellaire. La composition lipidique de la membrane cellulaire est ainsi asymétrique : les phosphatidylcholines (PC) et sphingomyélines (SM) sont préférentiellement localisées sur la face externe de la bicouche lipidique, alors que les phosphatidylsérines (PS) et phosphatidyléthanolamines (PE) sont présentes sur le feuillet membranaire interne. Cette asymétrie membranaire est maintenue par un système d'enzymes transmembranaires, les flippases, floppases et scramblases. L'aminophospholipide translocase ou flippase, est une enzyme dépendante de l'ATP et dont l'activité est inhibée par les concentrations de calcium intracellulaire (Zwaal and Schroit, 1997). Cette flippase contrôle le transport des lipides chargés négativement de l'extérieur vers l'intérieur de la bicouche lipidique. La floppase, transporteur ATP-dépendant, à l'inverse, contrôle le transport des phospholipides de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane plasmique (Gaffet et al., 1995). Enfin, la scramblase permet le transport bidirectionnel et aspécifique de phospholipides (PL) entre les deux feuilletts de la bicouche lipidique. Cette activité nécessite une concentration élevée de  $Ca^{2+}$  mais pas d'ATP (Zhou et al., 1997).

Les lipides sont aussi organisés sur le plan latéral. Cette ségrégation résulte d'un regroupement dynamique préférentiel des sphingolipides et du cholestérol au niveau de plateformes, communément appelées radeaux lipidiques (ou lipid-rafts) (pour revue (Simons and Gerl, 2010)). Ces microdomaines enrichis en lipides vont ainsi ségréger certains types de protéines notamment celles à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), les protéines doublement acylées, celles liant le cholestérol ou encore des protéines transmembranaires (souvent palmitoylées).

## **b) Perte de l'asymétrie membranaire et bourgeonnement**

Dans les cellules spécialisées comme les plaquettes, l'externalisation de la PS promeut le déclenchement de la coagulation. L'externalisation de la PS est aussi une caractéristique des cellules apoptotiques qui favorise leur reconnaissance par les macrophages et l'élimination par phagocytose. Lors de ce phénomène, la répartition asymétrique des PL membranaires est rompue et la PS rapidement exposée (Bassé et al., 1993). L'influx compensatoire de PC et SM, en lien avec les enzymes du remodelage membranaire, provoque une surcharge transitoire de PL sur le feuillet membranaire externe. Ce déséquilibre crée une augmentation de la courbure de la membrane favorisant la libération de MP (Fox et al., 1990). Néanmoins, les MP circulantes (isolées à partir du sang) ne lient pas toutes l'annexine-V et par conséquent, n'externalisent pas toutes la PS, suggérant différents modes de vésiculation des MP (Connor et al., 2010).

L'activation plaquettaire ainsi que l'apoptose sont les deux principaux stimuli de la production de MP. Au cours de l'activation cellulaire, la PS exposée recrute et concentre les facteurs de coagulation à la surface membranaire. Ainsi, les MP dérivées des cellules monocytaires, plaquettaires ou encore endothéliales possèdent un fort potentiel pro-coagulant (Morel et al., 2006). Leur participation dans le processus de coagulation est illustrée dans le syndrome de Scott, maladie hémorragique rare liée à un déficit d'exposition de la PS dû à une mutation sur la scramblase (Suzuki et al., 2010). En effet, l'émission de MP procoagulantes est quasi-nulle chez ces patients et contribue à la tendance hémorragique (Toti et al., 1996). Contrairement aux corps apoptotiques, les MP seraient libérées durant la phase précoce de l'apoptose (Beyer and Pisetsky, 2010).

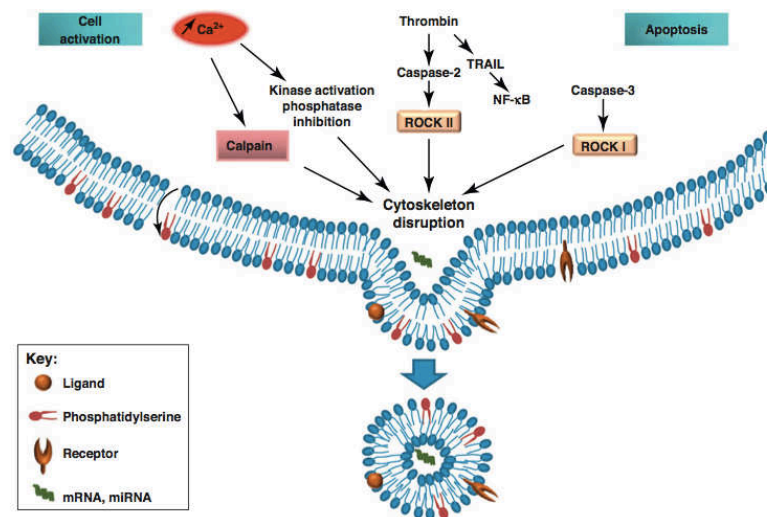
## **c) Rôle du $Ca^{2+}$ , des radeaux lipidiques et du cytosquelette dans la perte de l'asymétrie membranaire et la production de MP**

Dans les cellules plaquettaires activées, une augmentation soutenue de calcium ( $Ca^{2+}$ ) est nécessaire à l'externalisation de PS et à l'émission de MP (Figure 4). Cette augmentation de  $Ca^{2+}$  inhibe l'activité de la translocase et stimule l'activité des scramblases et floppases provoquant l'externalisation de PL et notamment de PS. Une entrée insuffisante de  $Ca^{2+}$  à travers la membrane plasmique serait ainsi associée au défaut d'exposition de PS chez les patients souffrant de Syndrome de Scott (Martínez et al., 1999). L'intégrité des radeaux lipidiques est requise pour cette entrée calcique et pour l'exposition membranaire des PS (Kunzelmann-Marche et al., 2002). Par ailleurs, l'augmentation calcique intracellulaire entraîne l'activation d'enzymes telles que la calpaïne qui déclenche une réorganisation du cytosquelette (Dachary-Prigent et al., 1995) nécessaire au bourgeonnement des MP. Enfin, de manière plus générale, le réseau de filaments d'actine est nécessaire au bourgeonnement membranaire et à la production de MP en réponse au flux intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Cauwenberghs et al., 2006;



Kunzelmann-Marche et al., 2001; Kunzelmann-Marche et al., 2002).

Cependant, d'autres mécanismes moléculaires ont été identifiés comme impliqués dans la production de MP, indépendamment d'une activation cellulaire. Ainsi, à l'interface entre l'activation et l'apoptose, la thrombine s'est révélée être un puissant inducteur de la libération de MP par les cellules endothéliales (Sapet et al., 2006) par activation de la caspase-2 et des Rho-kinases ROCK II, indépendamment d'une apoptose (Sapet et al., 2006). Une autre cascade de signalisation initiée par le clivage de la caspase-3 conduit à l'activation constitutive des sérines/thréonine kinases ROCK I (Rho-associated protein kinase-1), la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, provoquant ainsi une augmentation de la contraction cellulaire, favoriserait le bourgeonnement de MP (Sebbagh et al., 2001). Ainsi, bien que n'importe quelle cellule puisse émettre potentiellement des MP, les mécanismes moléculaires sous-jacents au bourgeonnement membranaire semblent différer selon le stimulus d'origine.



**Figure 4 : Mécanismes de formation des MP.** Au cours de l'activation cellulaire, l'augmentation intracellulaire de calcium induit un remodelage du cytosquelette de manière dépendante de la calpaine et conduit à l'externalisation de la phosphatidylsérine précédant le bourgeonnement de la membrane plasmique. D'autres voies indépendantes de l'augmentation calcique font intervenir les voies ROCK I et II. ROCK: Rho kinase, TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand (Martinez et al., 2011).

#### d) Régulation de la production de MP

Le remodelage membranaire associé à l'émission de MP est lié à des perturbations de l'influx calcique. En accord avec cette notion, plusieurs modulateurs des concentrations calciques intracellulaires incluant l'ionophore A23187 (Dachary-Prigent et al., 1995; Šimák et al., 2002), la thapsigargine (inhibitrice d'ATPase calcium dépendante)(Dachary-Prigent et al., 1995) ou encore l'ionomycine (Furlan-Freguia et al., 2011) ont été décrits comme induisant la production de MP à partir de différents types cellulaires *in vitro*.

Il en est de même pour des activateurs de l'apoptose tel l'actinomycine D (Martínez et al., 2006).

Des stimuli pro-inflammatoires incluant le TNF $\alpha$  ou le LPS (Gauley and Pisetsky, 2010), la thrombine (Sapet et al., 2006), la camptothécine (Šimák et al., 2002) ou l'inhibiteur du plasminogène PAI-1 (Brodsky et al., 2002) ont aussi été décrit comme augmentant la production de MP. L'angiotensine-II est aussi capable d'induire la production de MP endothéliales ou monocytaires *via* l'activation des kinases Rho (Burger et al., 2011; Cordazzo et al., 2013). Enfin, les forces de cisaillement liées au flux sanguin (« shear stress »), dont le débit est altéré dans des situations pathologiques, constituent en outre un stress mécanique modulant la production de MP endothéliales (Boulanger et al., 2007; Vion et al., 2013).

Une augmentation des taux circulants de MP est retrouvée dans de nombreuses situations physiopathologiques incluant les pathologies vasculaires à fort risque thrombotiques ou inflammatoires (Morel et al., 2011). En particulier, la plupart des stress conduisant à la libération de VE sont retrouvés dans les situations physiopathologiques associées à l'obésité (maladies cardiovasculaires, inflammation). Notamment, les taux circulants de MP pro-inflammatoires et procoagulantes sont augmentés chez des patients obèses et pourraient contribuer au développement de complications métaboliques (cf 1.3.1).

## **1.2. Méthodologie pour la détection et la quantification des VE**

Au cours de ces dix dernières années, le nombre d'études s'intéressant aux VE n'a cessé de croître. La capacité des VE à véhiculer des acides nucléiques (ARNm, microARN ou d'autres types d'acides nucléiques) et à réguler l'expression génique de cellules cibles a suscité un intérêt majeur (Mittelbrunn et al., 2011; Boon and Vickers, 2013). De surcroît, le contenu protéique et lipidique des VE peut aussi moduler des voies de signalisation dans les cellules cibles, illustrant leurs propriétés de vecteurs d'informations biologiques. Cependant, l'identification et la caractérisation des différentes populations de VE demeurent complexes, aucun marqueur à ce jour ne permet de distinguer formellement les exosomes des MP. Ainsi, la combinaison de plusieurs critères est généralement requise pour établir la présence et identifier le type de VE isolé : détermination de la taille, la morphologie, l'origine intracellulaire par l'identification de marqueurs endo-lysosomaux et des protéines des complexes ESCRT (Lötvall et al., 2014).

### **1.2.1. Isolation des VE**

Les VE, exosomes ou MP, peuvent être isolées à partir de surnageants de culture cellulaires, de fluides biologiques (sang, lymphe, urine) mais aussi de tissus comme en témoigne leur isolement à partir de foie (Baron et al., 2012), de la plaque d'athérome



(Mallat et al., 1999) ou encore de tumeurs (pour revue (D'Souza-Schorey and Clancy, 2012)).

Le protocole généralement utilisé pour isoler les exosomes ou les MP est basé sur une série de centrifugations différentielles, permettant de culotter et séparer les plus grosses vésicules (MP) des plus petites (exosomes) selon la vitesse de sédimentation. Ainsi, il est donc essentiel de respecter une progression dans la vitesse des centrifugations en commençant par l'élimination des débris cellulaires à 1 500g, puis l'isolement des MP, variant entre 10 000g et 50 000g selon les études (Baj-Krzyworzeka et al., 2005; Muralidharan-Chari et al., 2009) puis la sédimentation des exosomes à 100 000g. Enfin, on ne peut exclure que cette série de centrifugations induise la formation de petites vésicules artificielles dû au stress mécanique provoqué par la vitesse de rotation (pour revue (Colombo et al., 2014)).

Des méthodes alternatives ont ainsi été développées incluant une étape de filtration avant l'ultracentrifugation à 100 000g pour éliminer les débris cellulaires et les vésicules d'une taille supérieure généralement à 200 nm (Thery et al. 2006), ou utilisant la chromatographie par exclusion de taille pour isoler des vésicules de plus de 50 kDa et éliminer les protéines solubles (Taylor et al., 1983). Enfin l'utilisation d'ultracentrifugations à 140 000g (Baietti et al., 2012) voire 400 000g (Vyas et al., 2014) permettrait de culotter l'ensemble des exosomes. Ces différentes méthodes sont elles aussi discutables. Etant donné que la taille des VE se distribue entre quelques nm et environ 1µm, et que la taille de certaines populations de MP seraient du même ordre de taille que les exosomes (Bobrie et al., 2012; Kranendonk et al., 2014a), aucune de ces méthodes ne semble être satisfaisante. De plus, des ultracentrifugations à très haute vitesse (400 000g) peuvent aussi conduire à l'isolement conjoint d'exosomes et d'agrégats protéiques.

Enfin, les exosomes culottés par ultracentrifugation à 100 000g sont souvent purifiés sur gradient de sucrose ou ils vont généralement sédimenter à une densité comprise entre 1-15 et 1-19g/mL (Thery et al., 2001a). Cette purification est généralement combinée à une analyse par western-blot des différentes fractions de sucrose avec des protéines retrouvées à la surface de VE. Ce protocole a cependant lui aussi révélé que différentes classes d'exosomes sédimenteraient différemment sur gradient de sucrose (Bobrie et al., 2012).

Plus récemment, des méthodes s'affranchissant des étapes de centrifugations se sont développées. Elles se basent sur l'utilisation de polymères ou de billes de capture magnétiques conjuguées à des anticorps spécifiques reconnaissant des marqueurs exosomaux. Bien que ces méthodes apparaissent plus stringentes, elles s'affranchissent du fait que tous les VE ne porteront pas la protéine ciblée. De plus, ces préparations peuvent être contaminées par des protéines solubles reconnues par les anticorps (Théry

et al., 2001).

En conclusion, plusieurs méthodologies co-existent pour l'isolation des VE et peuvent être plus ou moins adaptées selon le type cellulaire étudié. Ceci pose la question de la légitimité à comparer des VE isolées dans différentes études selon des protocoles différents. L'isolation des VE combinée à la détection de marqueurs protéiques à leur surface peut contribuer à mieux caractériser les VE étudiées.

### **1.2.2. Marqueurs protéiques des VE**

Les protéines du complexe ESCRT (particulièrement les tétraspanines CD63, CD81 et CD9) ou les protéines associées (comme Alix, Tsg101) sont généralement utilisées comme marqueurs protéiques exosomaux. Leur présence permet de témoigner de la présence de membrane dans les préparations analysées (Bobrie et al., 2012). L'analyse protéique (qu'elle soit réalisée par Western-Blot, cytométrie en flux ou spectrométrie de masse) doit être quantitative afin de mesurer l'enrichissement de tels marqueurs dans les préparations exosomales par rapport aux autres fractions isolées ou aux lysats cellulaires (Lötvall et al., 2014). Cependant, la détection de ces marqueurs ne suffit pas à exclure la potentielle présence de contaminants. La présence concomitante de protéines endo-lysosomales (LAMP) ou impliquées dans le trafic membranaire (protéines Rab GTPases) ou dans la signalisation (synténines) est généralement étudiée. Il est aussi conseillé d'évaluer la présence de protéines associées à différents compartiments cellulaires autre que la membrane plasmique ou les endosomes comme des marqueurs du Réticulum endoplasmique (Calnexine) ou de l'appareil de Golgi (GM130). Enfin, la présence de protéines extracellulaires, incluant des protéines de la matrice extracellulaire ainsi que des facteurs sécrétés, peut varier selon l'origine cellulaire et le type de VE.

Contrairement aux exosomes, il n'existe pas de marqueurs protéiques membranaires caractéristiques des MP. La caractérisation des MP circulantes (lorsqu'isolées à partir de sang) consiste à détecter la présence d'antigènes membranaires spécifiques des cellules émettrices par cytométrie en flux, permettant de déterminer leur origine cellulaire (Table 1).

type cellulaire	antigène membranaire
Plaquettes	CD31+ CD41 + CD42a CD42b CD61
Cellules endothéliales	CD31+ CD41- CD62E CD34 CD51 CD105 CD144
Erythrocytes	CD235a
leucocytes	CD45 CD65 CD11a
Monocytes	CD14
macrophages	CD11b
granulocytes	CD66b
lymphocytes T	CD4 CD8 TCR

**Table 1 : Les MP circulantes portent des antigènes de surface caractéristiques des cellules émettrices.** CD31 n'étant pas spécifique des cellules endothéliales, un double marquage doit être réalisé pour différencier les MP endothéliales des MP issues des plaquettes.

La majorité des MP circulantes proviennent des cellules sanguines et du mur vasculaire incluant les plaquettes, les cellules endothéliales, les érythrocytes ou encore les cellules immunitaires (leucocytes, monocytes/macrophages, lymphocytes). Les MP d'origine plaquettaire sont largement majoritaires, représentant entre 70 à 90% des MP circulantes (pour revue (Martinez et al., 2011)). Une caractérisation fonctionnelle des MP peut aussi être réalisée sur la base de leur réactivité à l'Annexine-V (qui lie les PS) et/ou du facteur tissulaire (FT) qui initie la cascade de coagulation (Giesen et al., 1999). Ces deux dernières caractéristiques permettront d'estimer le potentiel pro-thrombotique et pro-inflammatoire des MP.

### 1.2.3. Analyse morphologique et quantification des VE

La structure morphologique et la taille des VE sont généralement étudiées par microscopie électronique à transmission. L'analyse microscopique peut aussi être couplée à la détection de marqueurs protéiques par utilisation d'anticorps couplés à des billes d'or (Witek et al., 2009). D'autres méthodes d'imagerie telle que la microscopie à force atomique pourrait permettre de mesurer la taille et la structure de chaque vésicule individuellement dans leur état natif (pour revue (Colombo et al., 2014)).

L'analyse de la distribution de taille des VE peut quant à elle être évaluée par cytométrie en flux, et mesurée en référence à des billes fluorescentes de diamètre connu (Baj-Krzyworzeka et al., 2005). Cependant, cette technologie ne permet pas l'identification d'objets biologiques dont la taille est inférieure à 300nm qui se confondent avec le bruit de fond, limite qui tend à décroître avec le développement de cytomètres haute-résolution (Hoen et al., 2012; van der Vlist et al., 2012).

Enfin, une simple mesure de la concentration protéique des préparations de VE (selon la méthode de Lowry ou Bradford) permet une quantification des VE sur la base de leur contenu protéique. Cependant, une telle quantification ne permet pas d'estimer la quantité (en nombre) de VE. En outre, l'analyse individuelle de chaque particule (ou « Nanoparticle Tracking Analysis ») basée sur le mouvement brownien des vésicules en suspension permet de mesurer à la fois la taille et la concentration des vésicules dont la taille varie de 10nm à 2µm (pour revue (Gardiner et al., 2015)).

#### 1.2.4. Composition moléculaire des VE

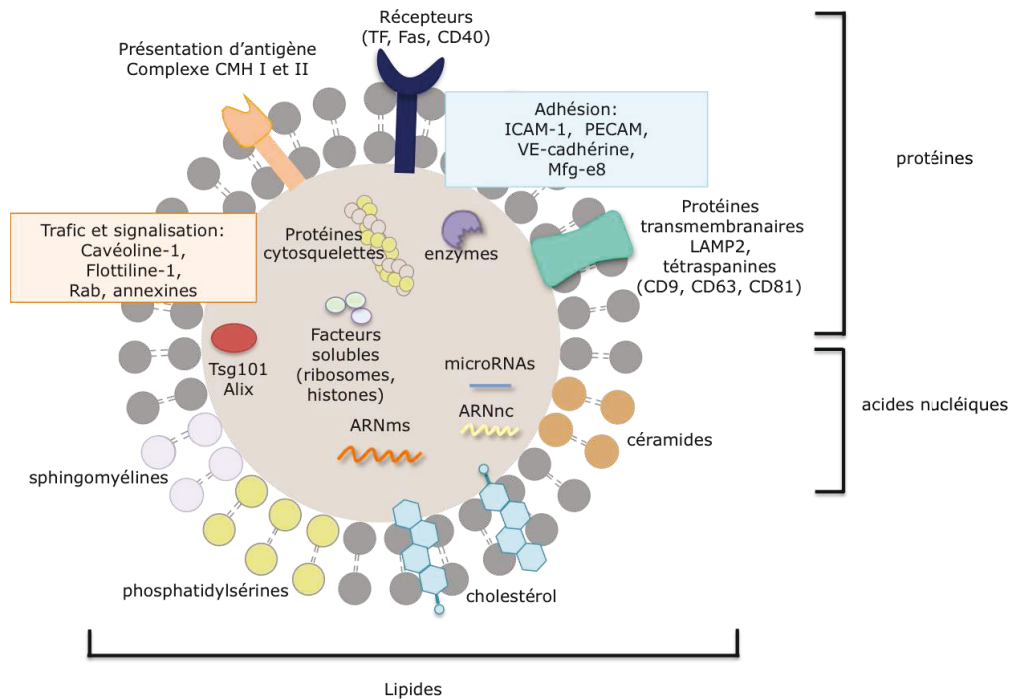
Les VE sont des microvésicules à double-membrane (bicouche lipidique) véhiculant à la fois des protéines, des acides nucléiques mais aussi des lipides.

La composition et la fonction des MP dépendent à la fois du stimulus qui a engendré leur libération et leur origine cellulaire. *In vitro*, l'activation cellulaire ou l'apoptose de cellules endothéliales induites respectivement par du TNFα ou suite à une déprivation en sérum induit la libération de MP ayant des compositions différentes et portant des glycoprotéines différentes (Jimenez et al., 2003). De manière similaire, une stimulation apoptotique (induite par l'actinomycine D) ou d'activation cellulaire induite par l'ajout supplémentaire d'agents mitogènes (Phytohémagglutinine A et Phorbol-Myristate acétate) dans une lignée de lymphocytes T humains induisent toutes deux la libération de MP. Cependant, les MP sécrétées dans des conditions d'activation cellulaire portent le morphogène Hedgehog, tandis que les MP apoptotiques en sont dépourvues (Martínez et al., 2006). Les VE reflètent aussi la composition moléculaire des cellules émettrices comme en témoigne la dissémination de variants oncogéniques du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor) par des exosomes de cellules de glioblastome (Al-Nedawi et al., 2008). Ces différences de composition associées au type de stimulation conditionnent le message biologique véhiculé par les VE mais aussi les cellules ciblées. De plus, la composition des VE reflète également l'organisation de la membrane plasmique et l'état physiologique de la cellule émettrice au moment de leur libération.

#### Protéines

La composition des VE reflète aussi, bien entendu, leur origine intracellulaire, à l'image des protéines endo-lysosomales véhiculées par les exosomes ou d'un enrichissement de protéines membranaires sur les MP (cf 1.2.2). De manière schématique (Figure 5), plusieurs protéines se retrouvent enrichies dans les exosomes à l'image des protéines dérivées du compartiment endo-lysosomal (ESCRT; Alix, LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein)), des tétraspanines (CD9, CD63, CD81), des protéines du trafic membranaire (GTPases Rab, annexines), des protéines de fusion SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) ou encore des protéines

des complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC I et II), des protéines chaperonnes (hsc73, synténines) mais aussi des protéines membranaires : Flottiline-1, Mfge-8 (Milk fat globule epidermal growth factor-8), cavéoline-1 (pour revue (Raposo and Stoorvogel, 2013)). L'analyse protéomique d'exosomes dérivés de cellules dendritiques montre que les exosomes présentent une composition différente des corps apoptotiques, et en particulier, véhiculent très peu de protéines provenant des organites intracellulaires (noyau, mitochondrie ou encore l'appareil de Golgi) (They et al., 2001b).



**Figure 5 : Composition générale des vésicules extracellulaires.** Les VE véhiculent à la fois du matériel génétique qui peut être transféré et transcrit dans les cellules cibles mais aussi des lipides ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans diverses voies de signalisation incluant l'immunité (CMH I et II), la coagulation (tissu factor, phosphatidylsérine), l'inflammation (molécule d'adhésion, FAS, CD40), le trafic membranaire (annexines), la signalisation (Rab) mais aussi des enzymes métalloprotéases favorisant la migration cellulaire et l'angiogénèse.

Les analyses protéomiques de MP endothéliales révèlent quant à elles un enrichissement en enzymes métaboliques, protéines d'adhésion et protéines du cytosquelette (Banfi et al., 2005) tandis que les MP plaquettaires véhiculent des glycoprotéines et des chimiokines (Garcia et al., 2005). De manière intéressante, un certain nombre de protéines impliquées dans les processus angiogéniques (Fas Ligand, le morphogène Hedgehog, des métalloprotéases, molécules d'adhésion) ainsi que des protéines du processus de coagulation (TF) sont portées par les MP participant ainsi à moduler la fonction vasculaire (pour revue (Martinez and Andriantsitohaina, 2011)).

## **Lipides**

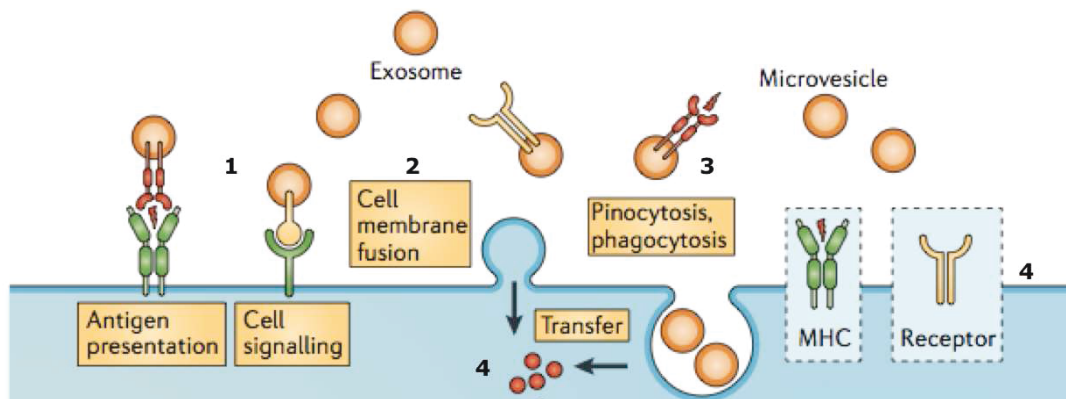
Par comparaison avec la membrane plasmique, les exosomes sont enrichis en cholestérol, SM et céramides aux dépens des phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines (Brouwers et al., 2013; Laulagnier et al., 2004; Subra et al., 2007; Wubbolts et al., 2003). De plus, les acides gras de la membrane des exosomes sont majoritairement saturés ou mono-insaturés. Cette composition lipidique pourrait refléter une ségrégation latérale de ces lipides dans les exosomes durant le processus de maturation des CM (Subra et al., 2007). Il existe en revanche peu de données concernant le contenu lipidique des MP. Une comparaison des contenus en cholestérol et en PL des MP plaquettaires a cependant révélé un fort enrichissement en cholestérol (Biró et al., 2005). Une analyse lipidomique plus large serait nécessaire afin de déterminer si ces MP ont pour origine préférentielle les radeaux lipidiques membranaires comme cela a été suggéré dans la littérature (Burger et al., 2011; del Conde, 2005).

## **Acides nucléiques**

Les VE véhiculent du matériel génétique, incluent des ARNs et microARNs, qui peuvent être transférés dans les cellules cibles. En particulier, les ARNm murins présents dans les exosomes peuvent être transcrits dans les cellules cibles (Valadi et al., 2007). Cette transcription des ARNm des VE peut être suivie d'une traduction en protéines qui pourrait participer au développement des cellules souches (Ratajczak et al., 2006) mais aussi des cellules tumorales (Baj-Krzyworzeka et al., 2005; Skog et al., 2008). De manière analogue, les microARNs pourraient moduler le phénotype des cellules cibles comme démontré pour les microARNs de MP macrophagiques capables d'activer la différenciation de monocytes circulants en macrophages (Ismail et al., 2013), ou encore ceux de MP dérivées de progéniteurs endothéliaux capables de réguler le processus d'angiogenèse dans les cellules endothéliales (Deregibus et al., 2007). Enfin, les VE véhiculent aussi des petits ARNs non codants (ARN de transfert, ARN de structures) qui pourraient réguler les processus transcriptionnels des cellules cibles (Nolte-t Hoen et al., 2012). Ainsi, les VE ont la capacité de véhiculer de l'information génétique, de la transférer et ainsi de moduler l'expression génique de cellules cibles.

### **1.2.5. Interaction des VE avec les cellules cibles**

Plusieurs types d'interactions ont été décrites entre les VE et les cellules cibles (Figure 6) incluant : une interaction spécifique ligand-récepteur (1), une fusion entre les membranes vésiculaires et cellulaires (2), ou une internalisation par endocytose ou phagocytose dans les cellules cibles (3) conduisant à un transfert du contenu des VE dans les cellules cibles protéines membranaires (4).



**Figure 6 : Mécanismes moléculaires d'interaction entre les vésicules extracellulaires et leurs cellules cibles.** Après leur libération dans le milieu extracellulaire, les VE peuvent être internalisées par endocytose ou phagocytose, et libérer leur contenu, activer des voies cellulaires dépendantes d'une interaction ligand-récepteur, fusionner avec la membrane plasmique ou encore transférer des récepteurs membranaires ou des ligands aux cellules cibles. Adapté de (EL Andaloussi et al., 2013).

Ces différents types d'interaction ont été illustrés dans la littérature dans divers processus cellulaires. Ainsi, l'activation cellulaire de lymphocytes T est associée à une augmentation d'exosomes CD81<sup>+</sup> dit « donneurs » qui, co-cultivés avec des monocytes CD81<sup>-</sup> receveurs, vont permettre le transfert de CD81 *via* les exosomes aux cellules receveuses (Fritzsching et al., 2002). De manière similaire, les MP participent également à la diffusion du VIH *via* le transfert du co-récepteur CXCR4 dans les lymphocytes B déficients en CXCR4 (Rozmyslowicz et al., 2003). La fusion membranaire des VE a été illustrée suite à la fusion de MP portant le facteur tissulaire avec la membrane de plaquettes activées, initiant la cascade de coagulation (del Conde, 2005). Enfin les exosomes et les MP marquées avec des fluorophores lipophiles sont rapidement internalisées dans les cellules cibles (pour revue (Ann Mulcahy et al., 2014)). Les VE peuvent aussi être internalisées par phagocytose (Feng et al., 2010) ou, dans les cellules dendritiques, par endocytose permettant de stimuler la réponse immunitaire adaptative (Morelli, 2004). En particulier, les VE de progéniteurs endothéliaux sont internalisées dans les cellules endothéliales *via* leur interaction avec les intégrines  $\alpha 4$  et  $\beta 1$  (Deregibus et al., 2007). Cette interaction pourrait être médiée *via* la lactadhérine/ Mfge-8, protéine très largement présente à la surface des VE (Théry et al., 1999). Cette endocytose des VE pourrait de plus être dépendante de microdomaines lipidiques membranaire spécifiques, telles les cavéoles, étant donné qu'elle peut être régulée par l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 (Svensson et al., 2013). Enfin, le récepteur aux LDL a aussi été décrit comme capable de lier les MP dérivées de lymphocytes-T proapoptotiques ce qui conduit à l'inhibition de l'angiogenèse et de l'expression du VEGF dans des cellules endothéliales (Yang et al., 2010).

## 1.3. Physiopathologie des VE

### 1.3.1. VE et pathologies cardio-métaboliques

La majeure partie des données établissant un lien entre VE et pathologies cardio-métaboliques sont liées aux MP. Concernant les exosomes, il n'existe aucune étude corrélative entre les concentrations circulantes d'exosomes et le développement de telles complications, notamment du fait des limites de résolution des technologies qui permettent de détecter des vésicules si petites à partir d'échantillons sanguins.

#### a) MP circulantes et dysfonction vasculaire

Les taux de MP circulantes sont altérés dans de nombreuses pathologies métaboliques associées à l'obésité, telles que l'athérosclérose, l'hypertension artérielle ou encore le diabète de type 2 (pour revue (Martinez et al., 2011)).

Ainsi, les taux de MP annexine V<sup>+</sup> et TF<sup>+</sup>, présentant un fort potentiel pro-coagulant, sont augmentés dans les pathologies cardiovasculaires à fort risque thrombotique. Ceci a conduit à considérer ces MP comme biomarqueurs potentiels de ces pathologies, puisqu'elles corrèlent de plus avec leur sévérité (Smalley and Ley, 2008).

Le taux circulant de MP d'origine endothéliale corrèle spécifiquement avec la dysfonction endothéliale (pour revue (Boulanger et al., 2006)). Ainsi, le taux de MP endothéliales circulantes (CD144<sup>+</sup>, VE-cadhérine) de patients souffrant d'insuffisance rénale corrèle avec une altération de la fonction vasculaire et *in vitro* entraîne une dysfonction endothéliale (Amabile et al., 2005). Par ailleurs, le syndrome métabolique (MetS ou Metabolic Syndrome), défini par l'association d'un certain nombre de critères physiologiques prédisposant au développement de complications cardio-métaboliques, est aussi associé à une augmentation du taux de MP circulantes (Agouni et al., 2008a). En particulier, les concentrations circulantes de MP d'origine endothéliale, plaquettaire (CD31<sup>+</sup>) et leucocytaires (CD62L<sup>+</sup>) sont significativement augmentées chez ces patients (Agouni et al., 2008a). Les MP isolées des sujets MetS (ayant un BMI ≥ 30) altèrent la fonction endothéliale *in vitro* et *in vivo* (lorsqu'injectées à des souris), *via* une diminution de l'activité NO synthase (Agouni et al., 2008b) et entraînent une hypo-réactivité vasculaire ainsi que la production de ROS et de MCP-1 dans les aortes de souris (Agouni et al., 2011). Une autre pathologie en lien avec le surpoids ou l'obésité, le syndrome d'apnées du sommeil (SAS), conduit à un profil de MP circulantes altéré (Priou et al., 2010). De manière analogue, les MP des patients SAS induisent *in vitro* une dysfonction endothéliale en altérant l'activité de la NO synthase endothéliale et par conséquent, la biodisponibilité du NO, et stimulent l'inflammation *via* l'induction du facteur pro-inflammatoire COX-2 (Priou et al., 2010). Les MP dérivées de la plaque d'athérome sont aussi des contributeurs majeurs de l'inflammation associée. En effet, ces MP sont



capables de transférer des molécules d'adhésion telle ICAM-1 aux cellules endothéliales et participent ainsi activement au recrutement des cellules pro-inflammatoires et à la progression de la plaque d'athérome (Rautou et al., 2011). Enfin, les MP pourraient aussi participer à la mise en place d'une insulino-résistance périphérique. En effet, les taux circulants de MP totales mais aussi d'origine plaquettaire corréntent avec le degré d'insulino-résistance et sont associés au développement d'un diabète de type 2 (Nomura et al., 1995; Tan et al., 2005; Zhang et al., 2014).

#### **b) MP circulantes et obésité**

Plusieurs travaux ont rapporté un taux accru de MP circulantes chez les patients obèses (Goichot et al., 2006; Gündüz et al., 2012; Murakami et al., 2007; Stepanian et al., 2013). Le taux de MP plaquettaires ne serait pas toujours associé au BMI ( $BMI \geq 30$ ) (Esposito et al., 2006a; Zhang et al., 2014; Murakami et al., 2007) mais serait corrélé à l'obésité viscérale comme les MP endothéliales ( $WHR \geq 0,8$  waist to hip ratio) (Esposito et al., 2006a; Murakami et al., 2007) suggérant un lien entre VE et le risque thrombotique associé à l'obésité.

Des résultats divergents ont cependant été rapportés concernant l'effet d'une perte de poids (suite à une restriction calorique ou à une intervention chirurgicale) sur le taux de MP circulantes n'identifiant pas clairement l'obésité comme facteur déclenchant (Cheng et al., 2013; Murakami et al., 2007; Stepanian et al., 2013; Zhang et al., 2014). De plus, de nombreuses molécules utilisées dans le traitement de ces pathologies métaboliques, telles que les statines (Tramontano et al., 2004) ou encore des glitazones (Esposito et al., 2006a) réduisent le taux de MP, suggérant qu'il s'agisse plutôt d'une conséquence de l'amélioration du statut métabolique au vu des mécanismes d'action différents de ces drogues (pour revue (Martinez et al., 2011)).

Les VE dérivées de TA d'obèses pourraient néanmoins contribuer à l'instauration de ces altérations métaboliques. En effet, les VE circulantes de rats obèses insulino-résistants stimulent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans des cellules endothéliales (Heinrich et al., 2015). L'injection de VE de souris obèses à des souris témoins conduit au développement d'une insulino-résistance liée à une conversion des macrophages vers un phénotype inflammatoire (Deng et al., 2009).

L'ensemble de ces données suggère donc un lien entre les MP et les pathologies cardio-métaboliques. Cependant, dans ce contexte d'altérations métaboliques, il est difficile de savoir si la production accrue de MP est le reflet des nombreuses altérations métaboliques, et contribue à les entretenir, ou si elle en est la cause en participant à leur instauration. Plus particulièrement, l'obésité, trait sous-jacent à l'ensemble de ces pathologies métaboliques, pourrait être l'élément déclencheur de la production accrue de MP.

### c) MP circulantes et inflammation

De nombreux stimuli inflammatoires parmi lesquels le TNF $\alpha$ , des cytokines pro-inflammatoires, LPS (lipopolysaccharide bactérien), les ERO, PAI-1 ou encore la thrombine ont été décrits comme de puissants inducteurs de la libération de MP (pour revue (Leroy et al., 2010)). En complément de leur rôle de marqueur d'un état inflammatoire, ces MP majoritairement dérivées du mur vasculaire peuvent également amplifier le signal inflammatoire dans leurs cellules cibles (pour revue (Andriantsitohaina et al., 2012)). Ainsi, l'activation des récepteurs TLR4 (Toll-like receptors) par le LPS, dans les monocytes THP-1 conduit à la sécrétion de MP procoagulantes et porteuses d'interleukines 1 $\beta$  (Wang et al., 2011). Ces MP monocytaires sont ensuite capables de propager, *via* le récepteur de l'interleukine-1, le signal pro-inflammatoire dans les cellules endothéliales et induire l'expression de molécules d'adhésion (VCAM, ICAM, E-selectine) de manière concentration dépendante (Wang et al., 2011). Les MP dérivées de cellules lymphocytaires T-CEM apoptotiques inhibent l'angiogenèse et l'expression du VEGF et favorisent la production d'ERO dans les cellules endothéliales humaines (Yang et al., 2008). *Ex vivo*, ces MP induisent une hypo-réactivité vasculaire dans l'aorte de souris et induisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules musculaires lisses (Tesse et al., 2005).

Le TNF $\alpha$ , quant à lui, induit la libération de MP endothéliales *in vitro* CD31 $^+$  (PECAM, platelet endothelium adhesion molecule-1), CD51 $^+$  (Vitronectin Receptor), ICAM-1 $^+$  (intercellular adhesion molecule-1) et CD62E $^+$  (E-selectin) (Tramontano et al., 2004) et procoagulantes (Combes et al., 1999; Jimenez et al., 2003; Tramontano et al., 2004). L'ensemble de ces types de MP est très nettement augmenté dans la circulation chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires (Sabatier et al., 2002) suggérant que ces MP pourraient moduler les réponses inflammatoires souvent associées aux pathologies cardio-métaboliques.

### d) Propriétés protectrices des MP

Malgré ces effets délétères sur la fonction vasculaire et l'inflammation, certaines propriétés des MP se révèlent aussi protectrices contre des agressions ou dans certains contextes pathologiques. Ainsi, les MP plaquettaires favorisent la survie et la prolifération cellulaire des cellules hématopoïétiques (Baj-Krzyworzeka et al., 2002) et participent également à l'homéostasie tissulaire. En particulier, les VE dérivées des cellules souches mésenchymateuses participeraient à la régénération cellulaire des cellules épithéliales rénales (pour revue (Tetta et al., 2011)). Enfin, les VE constituent de véritables acteurs dans l'angiogenèse, notamment *via* les nombreuses protéines aux propriétés angiogéniques qu'elles véhiculent. Les MP endothéliales portent par exemple des métalloprotéases fonctionnelles qui peuvent participer au remodelage de la matrice

extracellulaire, étape nécessaire dans la migration des cellules endothéliales et la formation de capillaires (pour revue (Boulanger et al., 2008)). Par ailleurs, les VE porteuses du morphogène Sonic Hedgehog (Shh) sont capables d'induire des réponses angiogéniques dans les cellules endothéliales en induisant l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) dans les cellules cibles ainsi que la migration et la formation de capillaires par les cellules endothéliales (cf 3.2.2). De part leurs propriétés pro-angiogéniques mais aussi cardioprotectrices (Paulis et al., 2015), ces VE apparaissent comme de potentiels vecteurs thérapeutiques dans le contexte des maladies cardiovasculaires. Leur potentiel thérapeutique est détaillé dans une revue que nous avons publié dans *Frontiers in Immunology* (Fleury et al., 2014) et présentée en Annexe 2 de ce manuscrit.

### 1.3.2. Rôle des VE dans l'immunité et les cancers

Les propriétés immunomodulatrices des VE ont été mises en évidence lors de la découverte de quantités non-négligeables de molécules du CMH-II portés par les exosomes produits par les lymphocytes B (Complexe Majeur d'histocompatibilité II) (Raposo et al., 1996). Ces études ont ainsi révélé la capacité de ces VE à présenter des antigènes et initier, voire amplifier, la réponse inflammatoire (pour revue (Chaput and Théry, 2011)). De nombreuses études s'intéressant aux exosomes dérivés de différentes cellules immunitaires ou tumorales ont confirmé la capacité de ces VE à stimuler la réponse immunitaire comme en témoigne la capacité d'exosomes produits par les lymphocytes B à stimuler les lymphocytes-T CD4<sup>+</sup> (Raposo et al., 1996). Des travaux démontrent aussi la capacité d'exosomes dérivées de plaquettes à stimuler l'activation des lymphocytes B (Sprague et al., 2008), suggérant qu'ils participent aussi à l'amplification de la réponse immunitaire. De plus, grâce à leur capacité à présenter des antigènes tumoraux *via* les complexes de CMH-I, les exosomes sont aussi impliqués dans la réponse anti-tumorale médiée par les lymphocytes-T CD8 activés (Wolfers et al., 2001). Enfin, l'injection d'exosomes libérés par les cellules dendritiques chez la souris induisent une stimulation des lymphocytes-T CD8 cytotoxiques et conduit au rejet de la tumeur illustrant un rôle des exosomes dans la réponse anti-tumorale *in vivo* (Zitvogel et al., 1998).

Cependant, ces réponses dépendent à la fois du contexte pathologique et de la composition des exosomes. En effet, la réponse induite dans les cellules cibles dépend des protéines portées par les exosomes mais aussi des régulations post-transcriptionnelles médiées par le transfert de microARN dans les cellules cibles (Valadi et al., 2007). Ainsi, les exosomes peuvent atténuer les réponses inflammatoires aiguës dans des modèles d'inflammation comme les souris DTH (Delayed-type hypersensitivity) (Kim et al., 2007). Cette diminution du statut inflammatoire est notamment liée à leur

capacité à induire l'expression dans les cellules cibles de molécules capables d'inactiver les lymphocytes-T ou supprimer la réponse immunitaire (pour revue (Zhang and Grizzle, 2011)).

Les exosomes, dont la sécrétion a largement été étudiée à partir de modèles de cellules immunitaires et tumorales, apparaissent ainsi comme des régulateurs clé de la réponse immunitaire. L'ensemble de ces données, non-exhaustive, a conduit à mesurer les taux d'exosomes (généralement en se basant sur la présence de marqueurs protéiques) dans un contexte cancéreux. Plusieurs cancers comme le glioblastome ou les cancers du pancréas présentent des taux anormalement élevés de certains types d'exosomes. Ainsi, plusieurs essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'intérêt d'utiliser ces exosomes comme biomarqueurs précoces de cancers, notamment pour ceux difficiles à diagnostiquer. Enfin, la capacité des exosomes dérivés des cellules dendritiques à potentialiser la réponse inflammatoire a conduit au développement d'essais cliniques en phase I et II (pour revue (Chaput and Théry, 2011)).



## 2. Le tissu adipeux : source de VE ?

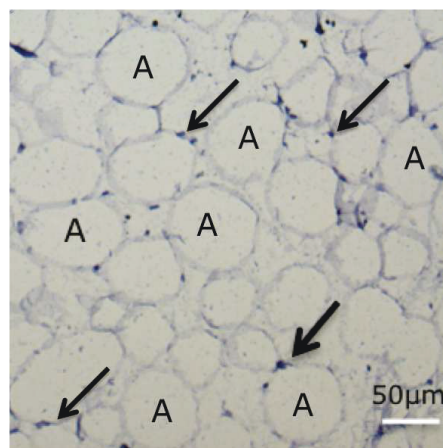
La capacité à stocker les nutriments, nécessaire pour fournir à l'organisme l'énergie pendant les périodes de privation, est une fonction vitale déjà présente chez les organismes unicellulaires. Le stockage des lipides dans un tissu dont la fonction est entièrement dédiée à la gestion et au stockage des lipides est apparu au cours de l'évolution chez les oiseaux et les mammifères. Bien que l'accumulation de lipides puisse exister dans d'autres types cellulaires, tels que le foie, les muscles et les macrophages, le TA est le seul organe spécialisé dans le stockage de triglycérides (TG) mobilisables à long terme.

### 2.1. Développement du tissu adipeux

#### 2.1.1. Les différents types de TA

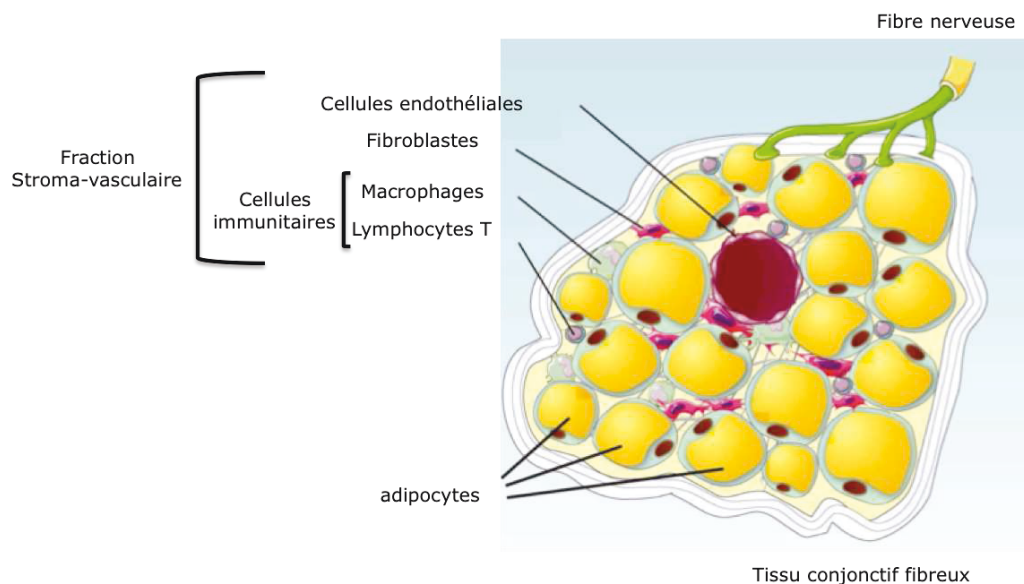
##### a) Le tissu adipeux blanc

Le TA blanc est organisé en lobules séparés par un tissu conjonctif fibreux riche en collagène I et III (pour revue (Tordjman, J., 2013)). Les adipocytes qui assurent le stockage et la mobilisation des lipides sont les cellules majoritaires du TA. La gouttelette lipidique, organite spécialisé dans le stockage des TG, occupe la quasi-totalité du cytoplasme de l'adipocyte. Cet organite est composé d'une monocouche de phospholipides et permet le stockage de lipides hydrophobes (pour revue (Dugail and Lay, 2013)). En conséquence la morphologie d'un adipocyte blanc est facilement reconnaissable par son aspect uniloculaire (Figure 7).



**Figure 7 : Coupe histologique de tissu adipeux blanc sous-cutané murin coloré à l'hématoxyline.** L'aspect uniloculaire des adipocytes dans le tissu adipeux est facilement reconnaissable. La gouttelette lipidique occupe la quasi-totalité du cytoplasme, tandis que le noyau se trouve repoussé à la périphérie cellulaire (indiqué par les flèches).

Les essais nucléaires menés lors de la Guerre Froide de 1955 à 1963 ont conduit à une forte élévation de carbone radioactif dans l'atmosphère qui a été intégré par les organismes vivants et, en particulier, dans leur génome. L'équipe de Peter Arner s'est basée sur la détection de carbone radioactif ( $^{14}\text{C}$ ) dans l'ADN génomique de TA sous-cutané de patients nés avant et après ces essais nucléaires pour estimer la durée de vie d'un adipocyte chez l'homme. Ainsi, à l'âge adulte, la durée de vie d'un adipocyte est estimée à dix ans (Spalding et al., 2008), pendant lesquels son contenu en TG est renouvelé 6 fois (Arner et al., 2011). La fraction stroma-vasculaire regroupe les cellules non-adipocytaires du TA c'est à dire les cellules immunitaires, endothéliales, les préadipocytes et fibroblastes. Le TA blanc est très vascularisé et chaque adipocyte est en contact avec au moins un capillaire (Figure 8) (pour revue (Tordjman, J., 2013)).

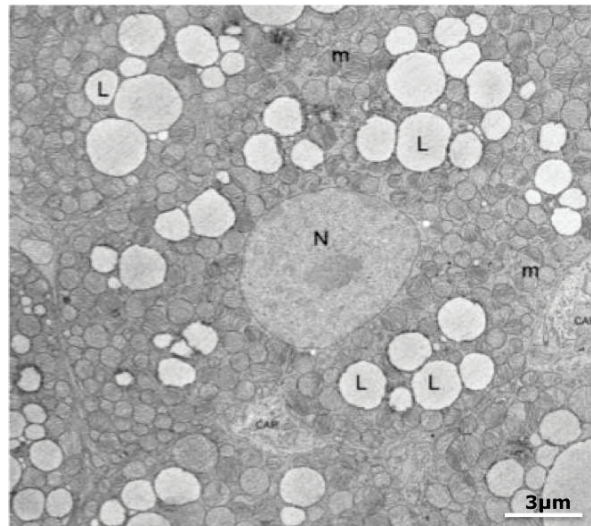


**Figure 8 : Composition du tissu adipeux blanc.** Le tissu adipeux blanc est divisé en lobules entourés de tissu conjonctif fibreux. Les adipocytes constituent 80% du TA, la fraction non-adipocytaire ou fraction stroma-vasculaire (FSV), est composée de cellules endothéliales, préadipocytes et de cellules immunitaires.

### b) Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun n'existe que chez les mammifères, capables de réguler leur température corporelle. Le TA brun, chez l'adulte, est retrouvé principalement au niveau des cervicales et dans les régions paravertébrales et supraclaviculaires (pour revue (Gesta et al., 2007)). Les adipocytes bruns (Figure 9) sont très riches en mitochondries et multiloculaires, contrairement aux adipocytes blancs, le diamètre de leurs gouttelettes lipidiques n'excède pas  $10\mu\text{m}$  (Wältermann and Steinbüchel, 2005). La densité des capillaires et des fibres nerveuses est également plus importante que dans le TA blanc (pour revue (Cinti, 2005)). Chaque adipocyte brun est directement innervé et sous contrôle de la noradrénaline qui stimule la thermogénèse *via* l'activation des récepteurs

$\beta_3$  adrénergiques. Il existe deux types de thermorégulation, 1°) basale, qui permet de maintenir la température corporelle à 37°C et 2°) stimulée, par exemple, par une exposition au froid. Les adipocytes bruns oxydent les AG et dissipent l'énergie produite par le gradient de protons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale sous forme de chaleur grâce à la protéine de découplage UCP-1 (Uncoupling protein-1) présente dans la membrane interne de la mitochondrie (pour revue (Ricquier, 2013)).



**Figure 9 : Microscopie électronique à transmission d'une coupe de tissu adipeux brun de rat.** Contrairement aux adipocytes blancs, les adipocytes bruns sont multiloculaires et riches en mitochondries. N : noyau, m : mitochondries, L : gouttelettes lipidiques. Adapté de (Giordano et al., 2014).

### 2.1.2. Répartition et hétérogénéité métabolique des dépôts de TA

Le TA blanc peut être classé en deux catégories : le TA de structure, peu sensible au jeûne et le TA de réserve. Le TA de structure a un rôle de protection et de soutien. Il est réparti au niveau des coussinets palmo-plantaires, dans les zones périphériques des grosses articulations et au niveau des orbites (Tordjman, J., 2013). Le TA de réserve se retrouve au niveau sous-cutané en localisation inguinale et au niveau viscéral (reins, gonades). La répartition du TA blanc varie selon l'âge, les dépôts sous-cutanés diminuant au profit des dépôts intra-abdominaux et le sexe : l'homme aura ainsi plutôt un développement des dépôts adipeux profonds (intra-abdominaux) tandis que les dépôts sous-cutanés (fesses, hanches et glandes mammaires) seront prédominants chez la femme (pour revue (Després, JP., 2001)).

La distinction entre le TA sous-cutané et viscéral repose sur les capacités métaboliques différentes. En particulier, la capacité respective de ces deux dépôts à stocker des lipides exogènes (Tchernof et al., 2006), à répondre à l'insuline (Laviola et al., 2006) ou encore à métaboliser le glucose (Virtanen et al., 2002) n'est pas équivalente. Ainsi, une obésité viscérale est plus sujette à engendrer des complications d'ordre métabolique comme le



diabète de type 2, l'insulino-résistance, des dyslipidémies ou encore des maladies cardiovasculaires. Ceci est illustré par le fait que l'obésité viscérale est un critère obligatoire du syndrome métabolique (Després and Lemieux, 2006).

### **2.1.3. Du préadipocyte à l'adipocyte : la différenciation adipocytaire**

Chez l'homme, la formation du TA *in utero* a lieu au cours du second trimestre de gestation. Il apparaît tout d'abord au niveau de la tête et du cou, progresse vers le tronc puis les membres et se développe essentiellement après la naissance (Gregoire et al., 1998; Poissonnet et al., 1984). La capacité du TA à augmenter sa taille joue un rôle crucial dans son développement et dans l'homéostasie énergétique. L'augmentation de la population adipocytaire peut survenir tout au long de la vie à partir du recrutement et de la conversion de cellules précurseurs présentes dans la fraction stroma-vasculaire (Ailhaud et al., 1992). Ainsi, les obésités humaines se caractérisent par une hyperplasie (augmentation du nombre d'adipocytes) et une hypertrophie adipocytaire (augmentation de la taille des adipocytes) (Spalding et al., 2008).

#### **a) Origine embryonnaire des adipocytes**

Les cellules souches mésenchymateuses isolées de la moelle osseuse sont capables de se différencier *in vitro* et *in vivo* en ostéoblastes, myocytes, chondrocytes ou en adipocytes blancs suggérant une origine mésodermique commune entre ces différents tissus (pour revue (James, 2013)).

Les préadipocytes bruns murins expriment le marqueur Myf5 comme les myoblastes, précurseurs du lignage musculaire squelettique (Seale et al., 2008). Ceci suggère que les adipocytes bruns sont plus proche des cellules musculaires que des adipocytes blancs (Figure 10). Dans le reste de ce chapitre, nous détaillerons uniquement la différenciation adipocytaire blanche.

#### **b) Modèles d'études de la différenciation adipocytaire**

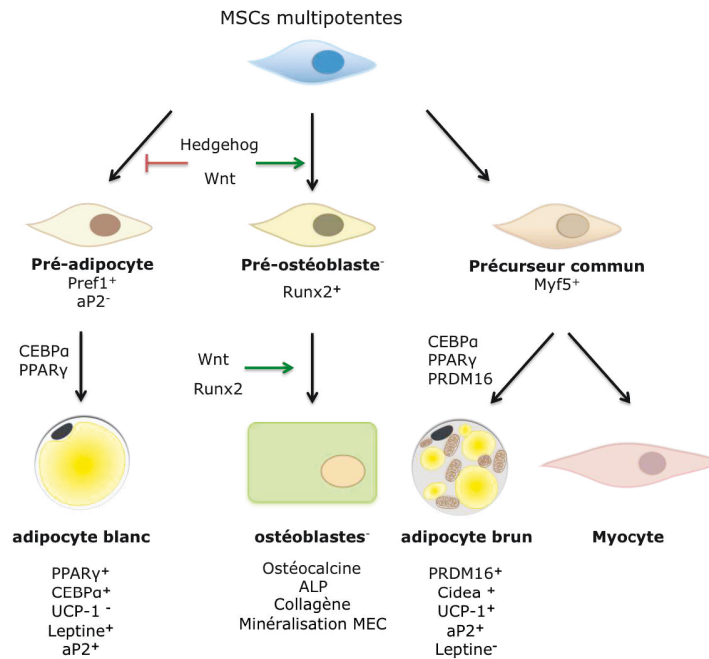
La capacité de la lignée murine C3H10T1/2, isolées à partir de cellules somatiques d'embryons murins, à former spontanément, en présence de l'agent déméthylant 5'azacytidine, des chondrocytes, des myoblastes ou adipocytes (Konieczny and Emerson Jr., 1984; Taylor and Jones, 1979) a contribué à décrypter les voies intervenant dans l'engagement de cellules multipotentes vers le lignage adipocytaire. D'autre part, différentes lignées cellulaires (3T3-L1, 3T3-F442A, Ob17) déjà déterminées vers le lignage adipocytaire ont été développées et constituent des modèles de choix pour les études *in vitro* (pour revue (Gregoire et al., 1998)). La validité de ces lignées cellulaires est confirmée par des expériences *in vivo* montrant que l'injection en sous-cutané de cellules préadipocytaires 3T3-F442A chez des souris athymiques permet le

développement d'un véritable TA (Mandrup et al., 1997).

Chez l'homme, la fraction stroma-vasculaire de tissu adipeux sous-cutané est une source de cellules souches multipotentes capables de se différencier *in vitro* en adipocytes, chondrocytes, myoblastes et ostéoblastes (Zuk et al., 2001) ou encore en neurones (Zuk et al., 2002). Le développement d'une lignée cellulaire de préadipocytes humains dérivé de ces cellules multipotentes, appelées hMADS (multipotent adipose-derived stem cells isolated from human adipose tissue) (Rodriguez et al., 2004) a permis la caractérisation des mécanismes moléculaires sous-jacents au renouvellement des progéniteurs adipocytaires (Villageois et al., 2011; Zaragosi et al., 2006, 2010) et à l'engagement vers le lignage adipocytaire ou ostéoblastique (Fontaine et al., 2008; Hafner and Dani, 2014; Plaisant et al., 2009).

### **c) Engagement des précurseurs vers l'état préadipocytaire**

Le processus d'adipogenèse décrit une phase d'engagement des cellules souches multipotentes vers le lignage adipocytaire et une phase terminale de différenciation des préadipocytes en adipocytes matures (Figure 10). Une relation inverse entre l'engagement des MSC vers le lignage adipocytaire ou ostéoblastique est dépendante des signalisations des morphogènes Hh et Wnt. L'engagement des précurseurs multipotents vers l'un ou l'autre lignage dépend de deux facteurs de transcription majeurs, PPAR $\gamma$ , régulateur majeur de l'adipogenèse, et Runx2, qui contrôle l'engagement vers l'ostéogénèse (James, 2013). Hh a ainsi été identifié comme un puissant inhibiteur de la différenciation adipocytaire (Suh et al., 2006). Les mécanismes mis en jeu par Hh dans le contrôle de la masse adipeuse sont détaillés dans le chapitre 3.3.1.



**Figure 10 : Lignages multiples des cellules souches mésenchymateuses et origine embryonnaire commune entre les adipocytes et les ostéoblastes.**

#### d) Du préadipocyte à l'adipocyte

Contrairement aux mécanismes fondamentaux sous-jacents à la phase de détermination adipocytaire pas encore totalement caractérisés, la phase de différenciation adipocytaire commence à être bien élucidée et a fait l'objet d'excellentes revues (Cristancho and Lazar, 2011; Rosen and MacDougald, 2006; Tang and Lane, 2012).

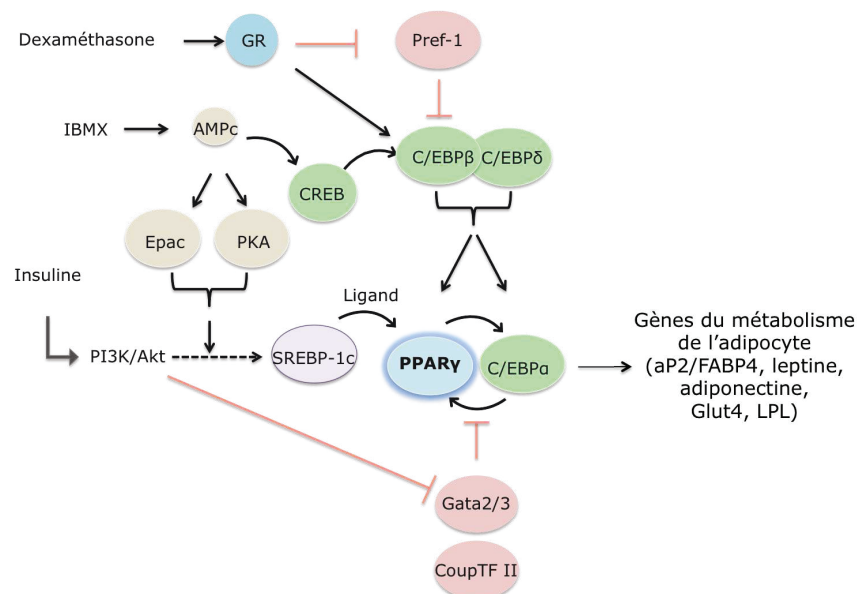
Le seul marqueur communément admis de l'état « préadipocyte » est Pref-1 (preadipocyte factor1 ou DLK-1 Delta-like protein-1) sécrété à la fois par les préadipocytes blancs et bruns. L'expression de Pref-1 est inhibée pendant la phase d'induction de la différenciation (Sul et al., 2000). *In vitro*, la surexpression de Pref-1 inhibe la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 tandis que l'inhibition de son expression favorise l'adipogenèse (Sul et al., 2000). *In vivo*, la surexpression de Pref-1 est associée à une perte des dépôts de TA chez les souris (Lee et al., 2003). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition restent à caractériser : ils feraient intervenir des facteurs de transcription de la famille Sox, qui réguleraient l'expression CEBPa et PPAR $\gamma$  (Sul, 2009).

#### Cascade transcriptionnelle de l'adipogenèse

La transition de l'état préadipocyte vers l'état adipocyte mature est un processus en 4 étapes : arrêt du cycle cellulaire, expansion clonale, une phase de différenciation précoce et une phase de différenciation terminale. Ces différentes phases sont orchestrées par une cascade transcriptionnelle faisant intervenir les facteurs de transcription de la famille CEBPs (CCAAT/enhancer-binding protein), des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  (Peroxisome

proliferator-activated receptor gamma) et des protéines à motif Hélice-Boucle-Hélice comme SREBP-1c/ ADD1 (Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1/ Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) (pour revue (Rosen and MacDougald, 2006)) (Figure 11). L'expression précoce et transitoire par les préadipocytes des protéines CEBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  permet l'expression de PPAR $\gamma$ . Ce dernier est à son tour responsable de l'induction des protéines C/EBP $\alpha$ . Les facteurs PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  vont alors assurer la transactivation d'un certain nombre de gènes aux fonctions adipocytaires clés (parmi ceux-ci Glut4 (Glucose Transporter type-4), le récepteur à l'insuline, aP2/FABP4 (Adipocyte Protein-2/ Fatty Acid Binding Protein-4), LPL (Lipoprotein Lipase), adiponectine) (Spiegelman, 1998). Quant au facteur ADD1/SREBP1c, il régule l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des AG et pourrait ainsi réguler la production de lipides, ligands naturels de PPAR $\gamma$  (Kim et al., 1998). Enfin, l'activité de CEBP $\alpha$  est régulée négativement par les facteurs de transcription anti-adipogéniques Gata2/3, qui lient les promoteurs de CEBP $\beta$  et CEBP $\alpha$  et, par conséquent, inhibent l'expression de PPAR $\gamma$  (Tong et al., 2005). Le facteur de transcription CoupTF II (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II) régulerait également l'expression des CEBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  *via* l'activation de la signalisation canonique Wnt dans le préadipocyte (Okamura et al., 2009).

*In vivo*, la création de souris transgéniques pour les différents facteurs de transcription clés a permis de valider ce processus de différenciation sur l'animal entier (Kubota et al., 1999; Rosen et al., 1999; Tanaka et al., 1997; Wang et al., 1995) (Figure 11).



**Figure 11 : Cascade transcriptionnelle intervenant dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes.** Dans les préadipocytes 3T3-L1 en phase G0 du cycle cellulaire, l'ajout du cocktail de différenciation (insuline, dexaméthasone et IBMX) active une cascade transcriptionnelle aboutissant à l'activation des facteurs clés adipogéniques PPAR $\gamma$  et CEBP $\alpha$  régulant l'expression des gènes adipocytaires.

### **Les 3T3-L1 : modèle cellulaire de différenciation adipocytaire**

La différenciation adipocytaire des 3T3-L1 est initiée par l'addition d'un cocktail de différenciation comprenant de l'insuline, un inhibiteur des phosphodiésterases (1-Méthyl-3-Isobutylxanthine ou IBMX) et un glucocorticoïde de synthèse (la dexaméthasone ou Dex). L'insuline va permettre de stimuler la lipogénèse et donc la synthèse *de novo* d'AG à partir du glucose extracellulaire. Dans les préadipocytes, la signalisation insulinique est médiée par la liaison de l'insuline aux récepteurs IGF (Insulin Growth Factor Receptor). L'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc, à travers l'inhibition des phosphodiésterases médiée par l'IBMX, induit l'activation de la protéine PKA (protein Kinase A) et potentialise l'effet de l'insuline *via* la voie de signalisation Epac (exchange protein directly activated by cAMP) (Madsen and Kristiansen, 2010). Enfin, l'ajout de la dexaméthasone au moment de l'induction de la différenciation induit une diminution de l'expression génique de Pref-1 de manière concentration-dépendante (Smas et al., 1999). L'activation du récepteur des glucocorticoïdes dans les préadipocytes participe également à l'activation de C/EBP $\beta$  *via* l'acétylation de son promoteur (Wiper-Bergeron et al., 2007) et induit l'expression de C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\delta$  (MacDougald et al., 1994).

#### **e) L'autophagie : un processus clé pour la différenciation adipocytaire**

L'autophagie est un processus adaptatif en réponse à une déprivation énergétique par lequel une cellule eucaryote peut dégrader et recycler ses propres composants, lui permettant de récupérer de l'énergie afin de maintenir son activité et sa survie. Cette dégradation est réalisée *via* la séquestration d'une portion du cytoplasme au sein d'un autophagosome qui fusionne ensuite avec les lysosomes entraînant la dégradation des composants cellulaires.

L'induction de la différenciation adipocytaire induit une autophagie massive dans les MEF (Baerga and Zhang, 2009) ou les MSC murines (Nuschke et al., 2014) suggérant que l'autophagie participe au remodelage du cytoplasme au cours de l'adipogénèse. La délétion de gènes clés de l'autophagie, tels Atg5 ou Atg 7, chez des souris entraîne une lipoatrophie (Baerga and Zhang, 2009; Singh et al., 2009). L'incapacité des MEF dérivés de ces animaux à se différencier en adipocytes a confirmé l'importance de ce processus dans la différenciation adipocytaire (Baerga and Zhang, 2009; Singh et al., 2009). Le rôle exact de l'autophagie dans l'adipogénèse reste encore à élucider. Cependant, à l'image du rôle de cette voie de dégradation récemment décrite dans la lipolyse, l'autophagie pourrait être un fort pourvoyeur de membranes permettant la croissance et le remplissage adéquats des GL (Kaushik and Cuervo, 2015).

## 2.2. Métabolisme de l'adipocyte

### 2.2.1. Fonction de stockage des lipides

Dans l'adipocyte blanc, les acides gras sont stockés sous forme de TG formés à partir de l'estérification de trois AG sur une molécule de glycérol. Ces AG proviennent soit de l'alimentation, soit de leur synthèse à partir du glucose (lipogénèse *de novo*). Ces TG sont ensuite stockés au sein d'un organe spécialisé : la gouttelette lipidique.

#### a) Stockage des lipides exogènes

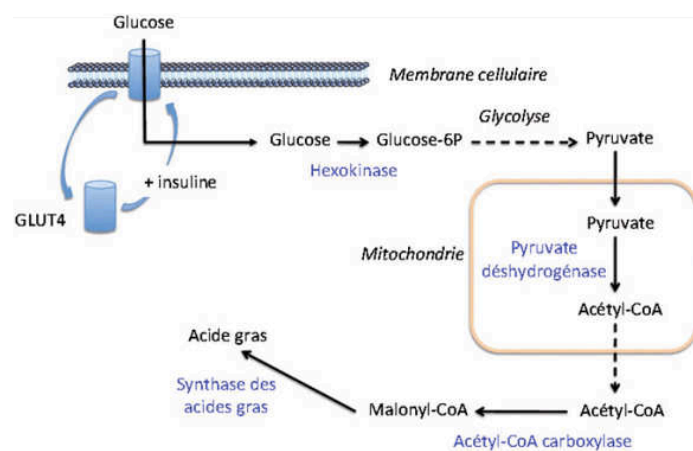
A l'état postprandial, les TG sont transportés dans la circulation sanguine par les lipoprotéines, en particulier les chylomicrons sécrétés par les entérocytes ou les VLDL (Very Low Density Lipoprotein) libérées par le foie. Ces TG sont captés et hydrolysés au niveau de l'endothélium du tissu adipeux par la lipoprotéine lipase (LPL). Dans le tissu adipeux, cette lipase est produite par les adipocytes et exportée vers la lumière de l'endothélium où elle lie des protéoglycanes contenant des structures héparane sulfate. L'accrochage de la LPL à la surface de l'endothélium est facilité par la protéine GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein-1), qui permet également de faciliter l'hydrolyse des TG par la LPL (pour revue (Young et al., 2011)). L'expression, l'activité et la sécrétion de la LPL sont induites par l'insuline. A l'état à jeun, les concentrations circulantes d'insuline étant diminuée, l'activité de la LPL est réduite dans le tissu adipeux, mais est induite dans les organes oxydatifs tels que le cœur et le muscle squelettique (pour revue (Foufelle and Ferré, 2013)).

La LPL hydrolyse les TG en acides gras (AG) et monoacylglycérol (MG) qui sont ensuite transportés dans l'adipocyte *via* des transporteurs membranaires, notamment les protéines FATP (fatty acid transporter protein), le récepteur FAT (Fatty Acid translocase)/CD36, puis pris en charge par les transporteurs intracellulaires FABP (Fatty acid binding protein). Dans l'adipocyte, c'est le transporteur FABP4 (aussi appelé aP2) qui est majoritairement exprimé (pour revue (Frohnert and Bernlohr, 2000)). Pour pouvoir être utilisés par la cellule pour la synthèse des TG, les AG subissent l'ajout d'un coenzymeA par l'AcylCoA synthétase.

#### b) Lipogénèse *de novo*

Cette voie consiste en la synthèse d'AG à partir de glucose qui seront ensuite estérifiés en TG (Figure 12). Dans le TA humain, la lipogénèse *de novo* est minoritaire et le stockage des AG s'effectue majoritairement *via* le stockage exogène des lipides (Galton, 1968). A l'inverse, les modèles cellulaires adipocytaires, sont très dépendant de la synthèse d'AG à partir de glucose. A l'état postprandial, l'insuline stimule le trafic vésiculaire du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique, qui permet

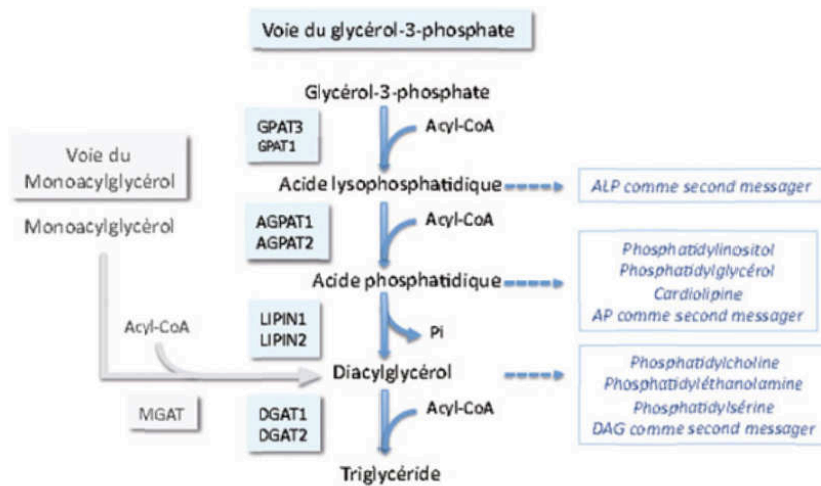
l'entrée du glucose dans la cellule. Le glucose est ensuite phosphorylé en glucose-6-phosphate et entre dans le cycle de la glycolyse pour produire du pyruvate. Dans la mitochondrie, le pyruvate est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. Transporté dans le cytoplasme, l'acétyl-CoA est ensuite transformé en malonyl-CoA par l'acétyl CoA carboxylase (ACC). Le malonyl CoA, qui est un inhibiteur de l'oxydation des AG, est le substrat de l'enzyme qui produit les AG, la FAS (Fatty Acid Synthase) (pour revue (Foufelle and Ferré, 2013)). L'insuline contrôle aussi l'expression de nombreuses enzymes lipogéniques, *via* l'activation du facteur de transcription SREBP-1c qui induit l'expression de nombreuses enzymes lipogéniques (Foretz et al., 1999; Lay et al., 2002).



**Figure 12 : Lipogénèse *de novo* dans l'adipocyte.** Contrairement aux rongeurs, la lipogénèse *de novo* se produit majoritairement dans le foie chez l'homme. (Foufelle and Ferré, 2013)

### c) Synthèse des TG

Dans l'adipocyte, la voie principale de synthèse des TG consiste en l'estérification d'un premier acyl-CoA sur une molécule de glycérol-3-phosphate par l'acylglycérophosphate acyltransférase (AGPAT) permet de produire l'acide lysophosphatidique, puis d'un second pour produire l'acide phosphatidique. Celui-ci est déphosphorylé pour produire un diacylglycérol (DAG). La diacylglycérol acyltransférase (DGAT), localisée au niveau du RE ou de la GL, va catalyser la dernière étape de synthèse des triglycérides (TGs) (Figure 13).



**Figure 13 : Voies de synthèse des TG dans l'adipocyte.** Dans l'adipocyte la synthèse des TGs à partir du glycérol-3-phosphate est la voie prédominante par rapport à la voie du monoacylglycérol. Les intermédiaires de la synthèse des TGs peuvent agir comme second messager ou constituer de plus des précurseurs d'espèce lipidiques. Adapté de (Foufelle and Ferré, 2013).

## 2.2.2. Fonction de mobilisation des lipides : la lipolyse

### a) Hydrolyse des TG

La lipolyse intracellulaire est la réaction d'hydrolyse des TG en AG et glycérol afin de fournir de l'énergie aux organes oxydatifs, muscles squelettiques, cœur, foie, reins, en cas de jeûne prolongé, ou d'exercice physique soutenu. L'hydrolyse des TG se fait séquentiellement *via* l'intervention de trois lipases : la lipase ATGL (Adipose TriGlycerides Lipase) convertit les TG en diacylglycérols (DG), la lipase hormono-sensible (hormone-sensitive lipase ou HSL) les DG en monoacylglycérols (MG) et enfin, la monoacylglycérol lipase hydrolyse les MG et libère les AG et le glycérol dans la circulation sanguine. Dans l'adipocyte, ATGL et HSL sont responsables de 90% de la lipolyse (pour revue (Zechner et al., 2012)).

### b) Contrôle hormonal de la lipolyse

De fortes concentrations de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) activent les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) et stimule l'adénylate cyclase qui catalyse la production d'AMPC à partir d'ATP (Figure 14). L'augmentation des taux intracellulaires d'AMPC entraîne l'activation de la PKA qui phosphoryle sur les résidus sérine la périlipine-1, protéine structurale de la gouttelette lipidique, et la HSL. La phosphorylation de périlipine-1 provoque un changement de sa conformation et sa dissociation avec CGI-58 (comparative gene identification-58), le co-activateur de la lipase ATGL. La phosphorylation de la HSL entraîne aussi sa translocation et son association avec périlipine-1 au niveau de la gouttelette lipidique. Les catécholamines régulent la lipolyse *via* les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques lipolytiques et les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques anti-lipolytiques. La proportion de récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénérgiques adipocytaire et l'affinité

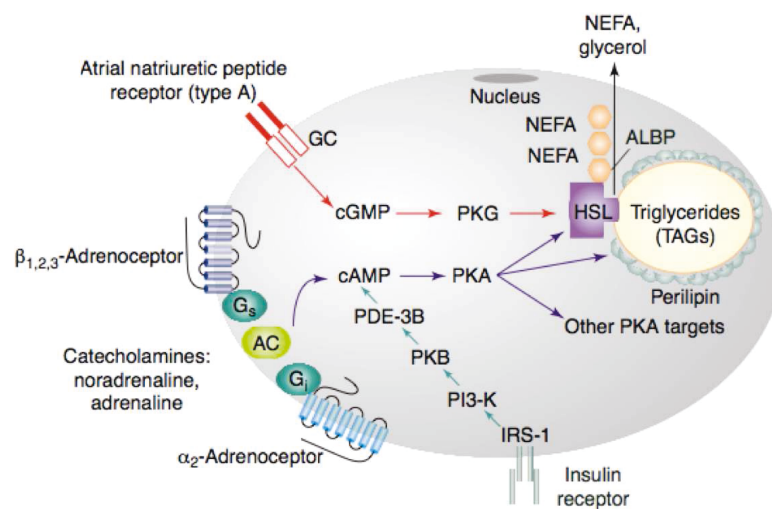


des catécholamines pour ces récepteurs sont déterminantes dans la régulation de l'activité lipolytique (Figure 14) (pour revue (Lafontan and Berlan, 2003)).

Différents agents pharmacologiques modulant les concentrations intracellulaires d'AMPc peuvent induire la lipolyse. En particulier, la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, l'IBMX, inhibiteur des phosphodiesterases, peuvent activer la PKA. Enfin, la lipolyse chez les rongeurs peut être stimulée par des agonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, tels que l'isoprotérénol (pour revue (Duncan et al., 2007)).

En revanche, l'insuline, est un agent anti-lipolytique majeur. Cette hormone induit une dégradation de l'AMPc *via* l'activation de la voie PI3K/Akt, la stimulation des phosphodiesterases 3B et l'activation de phosphatases qui déphosphorylent et inactivent la HSL (pour revue (Lafontan and Berlan, 2003)).

La voie de l'AMPc n'est pas la seule voie hormonale contrôlant la lipolyse. Les peptides natriurétiques ANP (Atrial Natriuretic Peptide) et BNP (Brain Natriuretic Peptide) stimulent la lipolyse *via* leurs récepteurs possédant une activité guanylate cyclase, activent la PKG qui phosphoryle et active la HSL de manière similaire à la PKA (pour revue (Lafontan and Berlan, 2003)) (Figure 14).



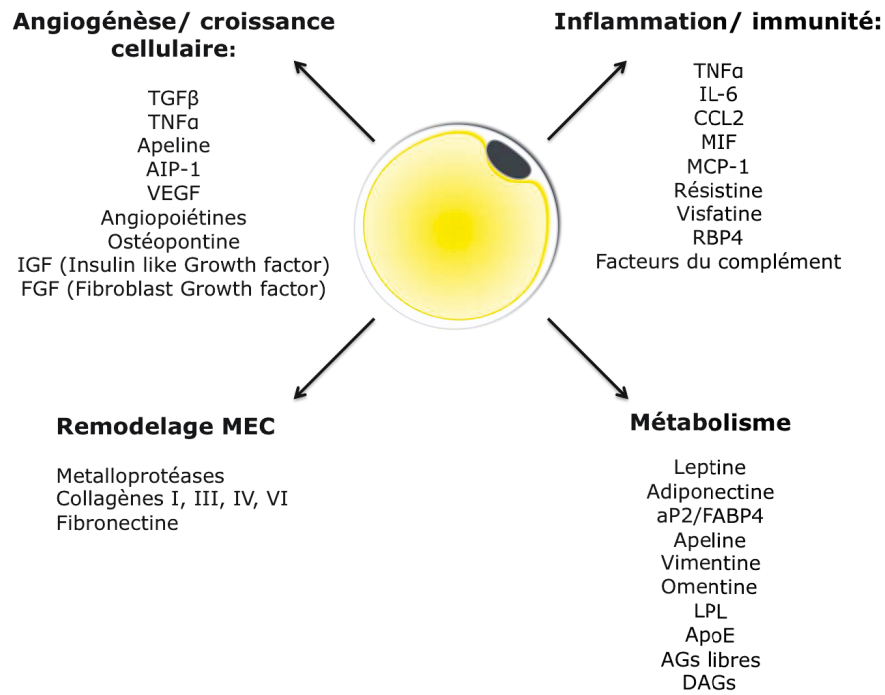
**Figure 14 : Régulation de la lipolyse adipo-cytaire.** La liaison des catécholamines aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques couplés aux protéines  $G_s$  stimule la production d'AMPc par l'adénylate cyclase (AC) conduisant à l'activation de la PKA et la phosphorylation de la lipase hormono-sensible (HSL). A l'inverse, l'activation des récepteurs anti-lipolytiques  $\alpha$ -adrénergiques couplés aux protéines  $G_i$  inhibe l'activation de l'AC et l'activation de la PKA. D'autre part, l'insuline inhibe la lipolyse *via* l'activation de phosphodiesterases responsables de la dégradation de l'AMPc. Enfin, l'activation des récepteurs couplés à la guanylate cyclase (GC) conduit à l'activation de la PKG et la phosphorylation activatrice de la lipase HSL. Adapté (Lafontan and Berlan, 2003).

### 2.2.3. Fonction endocrine : sécrétion d'adipokines

La théorie lipostatique où une hormone produite par le tissu adipeux contrôlerait la prise alimentaire a été suggérée pour la première fois dans les années 50 (Kennedy, 1953). Par la suite, le clonage du gène Ob a permis de mettre en évidence le rôle de la leptine, hormone sécrétée par l'adipocyte, dans le contrôle de la prise alimentaire (pour revue

(Friedman, 2014)). Enfin, la découverte que d'autres cytokines étaient produites par le TA, notamment le TNF $\alpha$  impliqué dans la régulation de la sensibilité à l'insuline, a mis en évidence la nature du TA comme organe endocrine et son rôle dans la régulation du métabolisme énergétique (pour revue (Galic et al., 2010)). A travers leurs fonctions autocrine, endocrine et paracrine, les cytokines secrétées par les adipocytes, ou adipokines, influencent la fonction des organes clés dans l'homéostasie métabolique (foie, cœur, vaisseaux, muscles) mais participent aussi à la plasticité du TA à travers notamment la régulation de sa vascularisation.

Dans un contexte d'obésité, l'hypertrophie adipocytaire entraîne une modification du profil sécrétoire des adipocytes. Parmi les nombreux facteurs sécrétés par les adipocytes, on retrouve des facteurs protéiques ou lipidiques dont la sécrétion corrèle souvent avec la taille adipocytaire (Figure 15). Ces différents facteurs libérés par les adipocytes peuvent être regroupés en quatre catégories selon leurs fonctions : régulation du métabolisme énergétique, immunité/inflammation, remodelage tissulaire et vasculaire. Parmi ces nombreuses adipokines, dont la liste ne cesse de croître, un certain nombre de facteurs ont été associés au développement de l'état d'insulino-résistance ou inflammatoire (pour revue (Halberg et al., 2008)). En revanche, certaines adipokines comme l'adiponectine, dont la sécrétion est diminuée au cours de l'obésité, est une hormone insulino-sensibilisatrice. Ces facteurs sont des régulateurs majeurs de la communication entre le TA et le reste de l'organisme. De manière intéressante, un certain nombre d'entre eux ont été identifiés comme pouvant être sécrétés *via* les VE (cf 2.3.2).



**Figure 15 : Représentation schématique des principaux facteurs sécrétés par l'adipocyte.** Ces facteurs sont classés selon leur implication dans la régulation des processus cellulaires. MEC : Matrice Extracellulaire.

## 2.3. Les VE dérivées du tissu adipeux

De nombreuses pathologies cardio-métaboliques sont associées à l'obésité, lié au fait que le TA n'est plus capable de faire face correctement à un afflux massif d'acides gras. Ainsi, de nombreux stress cellulaires, ou réponses adaptatives, sont activés dans ce contexte physiopathologique. De manière intéressante, nombre de ces stress sont aussi associés à la production de VE.

### 2.3.1. L'obésité : un contexte physiopathologique favorable à l'émission de VE

#### a) L'obésité : un état inflammatoire chronique de bas grade

Les macrophages, infiltrés dans les tissus, participent à la réponse immunitaire innée *via* la phagocytose de pathogènes ou de débris cellulaires. Chez les individus non-obèses, les macrophages résidents de type « M2 » sont peu inflammatoires et participent à la réparation tissulaire et l'angiogenèse (pour revue (Mosser, 2003)). L'expansion rapide du TA au cours de l'obésité est associée à une modification du phénotype des macrophages résidents majoritairement de type « M2 », considérés comme peu inflammatoires vers un type « M1 » (Lumeng et al., 2007) qui secrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, TNF $\alpha$  ou MCP-1 (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Cette infiltration macrophagique est proportionnelle à la masse du TA et à la taille des adipocytes, et peut représenter, chez l'homme, jusqu'à 40% de la population cellulaire totale (Weisberg et al., 2003). Ces macrophages « M1 » s'assemblent autour d'un adipocyte en fin de vie, (Cinti et al., 2005). Cet assemblage « en couronne » des macrophages est fréquemment observé dans le TA viscéral de sujets obèses (Cancello et al., 2006). D'autres cellules immunitaires s'accumulent dans le TA obèse, notamment des neutrophiles et des lymphocytes T. En particulier, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, précèdent l'infiltration des macrophages « M1 » suggérant un rôle de ces cellules dans l'initiation de l'inflammation du TA obèse (Nishimura et al., 2009). Les macrophages vont aussi inhiber le recrutement et la différenciation des préadipocytes *via* la production de cytokines ou de morphogènes anti-adipogéniques tels que Wnt5a (Bilkovski et al., 2011; Lacasa et al., 2007). De surcroît, la sécrétion accrue de molécules chimioattractantes par les adipocytes hypertrophiques telles MCP-1 (Monocyte Chemoattractant protéin-1)/CCR2 (chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)) (Christiansen et al., 2004) favorise le recrutement et l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires (Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006). De nombreux travaux ont montré un lien entre cet état inflammatoire et le développement d'un état d'insulino-résistance. De plus, l'incapacité du TA à stocker correctement les lipides en excès va favoriser leur accumulation ectopique dans des

tissus non spécialisés et le phénomène dit de « lipotoxicité » (pour revue (Slawik and Vidal-Puig, 2007)).

Plusieurs stress cellulaires associés au développement excessif de la masse grasse vont aussi contribuer à entretenir cette inflammation. L'expansion rapide du TA crée des zones d'hypoxie dans le TA (Halberg et al., 2009; Ye et al., 2007; Yin et al., 2009). La surexpression de HIF1- $\alpha$  (hypoxia inducible factor) dans le TA conduit ainsi à une accumulation accrue de TG dans le foie, à l'image du phénomène de lipotoxicité associée à l'obésité. Ces animaux insulino-résistants, présentent une infiltration de macrophages pro-inflammatoires et de lymphocytes-T cytotoxiques dans leur TA (Rausch et al., 2007) et une hypersécrétion de cytokines pro-inflammatoires au sein du TA (Ye et al., 2007; Halberg et al., 2009). Par ailleurs, l'activation de HIF1- $\alpha$  participe aussi à l'installation d'une insulino-résistance en induisant le désassemblage des cavéoles et par voie de conséquence la signalisation insulinique (Regazzetti et al., 2009).

#### **b) Autres stress cellulaires associés à l'obésité**

Le TA adipeux de sujets obèses est aussi associé à une augmentation du stress oxydant, en lien particulièrement avec une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Furukawa et al., 2004). Dans un contexte d'obésité, l'augmentation d'ERO contribue à l'établissement d'un stress oxydant généralisé qui favorise l'inflammation du TA en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires et en diminuant la production d'adiponectine, hormone insulino-sensibilisatrice (pour revue (Le Lay et al., 2014)).

Enfin, l'obésité apparaît comme une pathologie associée à un stress du réticulum endoplasmique dans le TA (Özcan et al., 2004) et participerait au développement de l'insulino-résistance, notamment en inhibant le transport de glucose stimulé par l'insuline (Özcan et al., 2004).

#### **2.3.2. Le tissu adipeux : source de VE ?**

Les stress inflammatoires associés au remodelage profond du TA dans un contexte d'obésité sont identifiés comme favorisant la production de VE *in vitro*. Ainsi, la libération de VE par les cellules endothéliales (Combes et al., 1999; Jimenez et al., 2003; Tramontano et al., 2004) ou les monocytes (Aharon et al., 2008; Wang et al., 2011) est provoquée par le TNF $\alpha$  ou le LPS respectivement. L'hypoxie est aussi un stress induisant la libération de VE à l'image de la déprivation en oxygène associée à la croissance rapide des cellules cancéreuses qui favorise la libération d'exosomes (Vince et al., 2009). Enfin, le stress oxydant (Hjuler Nielsen et al., 2015) ou le stress du RE (Dachary-Prigent et al., 1995; Savina et al., 2003) sont aussi décrits comme stimulant la production de VE. Ceci suggère que l'état d'obésité pourrait favoriser la production de VE dérivées du TA.

### **a) Les VE dérivées des explants de TA**

La mise en culture d'explants de TA a permis d'établir la capacité du tissu adipeux à libérer des VE, puisque des exosomes ont été isolés des surnageants dès 30 min de culture *ex vivo* (Deng et al., 2009). La quantification protéique de la production de VE exprimée en µg de protéines par gramme de TA, suggère que la libération d'exosomes par des explants de TA viscéraux de souris obèses (ob/ob) est accrue comparée à celle des explants de TA de souris témoins (ob/+) (Deng et al., 2009).

De plus, ces exosomes dérivés de souris obèses influencent *in vitro* la différenciation de monocytes en macrophages « M1 », sécrétant TNFα et IL-6. De manière similaire, des exosomes dérivés d'explants de TA viscéraux humains stimulent aussi l'activation macrophagique de monocytes (Kranendonk et al., 2014b). De manière intéressante, l'injection d'exosomes dérivés du TA de souris obèses à souris contrôles est associée à une augmentation significative des taux circulants d'IL-6 et induit une insulino-résistance dans le foie et le muscle squelettique (Deng et al., 2009). Les exosomes dérivés d'explants de TA humains modulent aussi la phosphorylation de PKB/Akt en réponse à l'insuline et l'expression d'enzymes de la néoglucogenèse dans des hépatocytes HepG2 et cellules musculaires C2C12 (Kranendonk et al., 2014c). Enfin, des exosomes libérés *ex vivo* à partir de TA de patients obèses, induisent l'expression de protéines favorisant la fibrose telles que des métalloprotéases ou PAI-1 lorsqu'incubés sur des hépatocytes HepG2 *in vitro* (Koeck et al., 2014).

L'ensemble de ces données illustre la capacité du TA à produire des exosomes qui pourraient modifier le métabolisme de cellules cibles au cours de l'obésité. Ces VE provenant d'explants de TA, il est néanmoins impossible de distinguer la contribution relative des adipocytes par rapport à celle de la fraction SVF dans la production de ces VE. Cependant, certains exosomes isolés d'explants de TA humains portent l'adiponectine, démontrant la capacité des adipocytes à produire des exosomes (Kranendonk et al., 2014a).

### **b) Les VE libérées par les adipocytes**

La capacité des adipocytes à produire des exosomes a été démontrée à partir d'adipocytes 3T3-L1 (Tanaka et al., 2007), des adipocytes isolés de rat (Müller et al., 2009) ou encore d'une lignée adipocytaire humaine (Kranendonk et al., 2014b). Ces exosomes adipocytaires portent des protéines marqueurs de la fraction exosomale : CD9, CD81, CD63, Flottiline-1. Ces exosomes transportent également des protéines d'intérêt dans le métabolisme lipidique (Mfge-8, aP2/FABP4, CD36, FAS, LPL), des adipokines (adiponectine, visfatine, résistine, leptine ou encore MCP-1 (Kranendonk et al., 2014a; Ogawa et al., 2010; Tanaka et al., 2007)). Les exosomes isolés d'adipocytes 3T3-L1 véhiculent de plus de grandes quantités d'ARNm (>6000 transcrits) et ≈150 microARNs

(Ogawa et al., 2010). Parmi ces ARNm, on retrouve des transcrits codant pour les protéines adiponectine, Mfge-8, résistine, aP2/FABP4 et également pour le facteur PPAR $\gamma$  (Ogawa et al., 2010). Enfin, des exosomes portant l'adiponectine, ainsi que son ARNm, ont été isolés à partir de sérum murin suggérant que les exosomes adipocytaires pouvaient se retrouver dans la circulation sanguine (Ogawa et al., 2010; Phoonsawat et al., 2014). La présence de l'adiponectine sur les VE peut s'avérer surprenante, compte tenu de sa voie de sécrétion *via* le RE et le Golgi relativement bien caractérisée (Qiang et al., 2007; Wang et al., 2007). Cependant, bien qu'il ne semble pas s'agir d'une voie de sécrétion principale, une proportion non négligeable d'adiponectine est sécrétée *via* l'intermédiaire des VE (DeClercq et al., 2015). Cette voie de sécrétion de l'adiponectine est indépendante de l'effet de drogues telle la Bréfeldine A (DeClercq et al., 2015). L'hypoxie (Sano et al., 2014) et l'hyper-insulinémie (Kralisch et al., 2014) sont deux stimuli identifiés comme modulant la libération et la composition des exosomes adipocytaires *in vitro*. Des modulateurs du flux calcique ont aussi été associés à une augmentation de la sécrétion d'exosomes (Kralisch et al., 2014) et de VE portant l'adiponectine (Komai et al., 2014). L'ensemble de ces données révèle la capacité des adipocytes à sécréter des VE qui ont été aussi retrouvées dans la circulation sanguine. De part leur composition protéique et nucléaire, ces VE adipocytaires pourraient participer à l'inflammation chronique de bas grade associée à l'obésité. En revanche, aucune étude ne s'est intéressée à comparer la production d'exosomes entre adipocytes d'obèses ou témoins. De plus, la fraction des MP dérivées des adipocytes n'a jamais été clairement isolée ni caractérisée.

## 3. Un morphogène associé aux vésicules extracellulaires : Sonic Hedgehog

La signalisation Hedgehog (Hh) est largement conservée au cours de l'évolution de la drosophile aux mammifères. L'intégrité de cette voie de signalisation est cruciale au cours du développement embryonnaire. Cependant, le rôle de ce morphogène n'est pas restreint à l'embryogenèse, et Hh contribue aussi à maintenir l'homéostasie cellulaire chez l'adulte.

### 3.1. La signalisation Hedgehog (Hh)

#### 3.1.1. Importance de la signalisation Hh dans les processus développementaux et l'homéostasie tissulaire

##### a) Les protéines Hedgehog : structure et maturation

L'importance de la signalisation Hh dans le développement embryonnaire précoce a été révélée dans les années 1980, suite à un criblage génétique chez *Drosophila melanogaster*. Une mutation perte de fonction de la protéine Hh entraîne la perte de la polarité antéro-postérieure des segments embryonnaires (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). L'épiderme des embryons mutants  $Hh^{-/-}$  recouvert de denticules ou excroissances de l'épiderme a conduit à nommer ce gène «Hedgehog» (Hérisson en français).

#### Les différents ligands chez les vertébrés

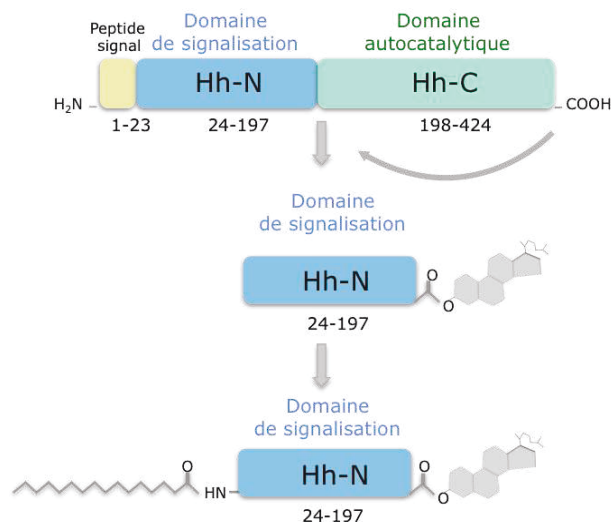
Contrairement à la drosophile, chez les vertébrés, 3 gènes Hh dus à une duplication du gène Hh de la mouche au cours de l'évolution ont été identifiés : Desert (Dhh), Indian (Ihh) et Sonic (Shh)(Ingham and McMahon, 2001; McMahon et al., 2003). Les protéines présentent de fortes homologues de séquences, en particulier dans leur partie N-terminale (Marigo et al., 1995; Pathi et al., 2001).

Les protéines recombinantes Ihh, Shh et Dhh ont la même structure et lient le récepteur Patched-1 (Ptch) avec la même affinité ( $IC_{50} : 3-7nM$ ). Elles sont capables d'induire l'expression du facteur de transcription Gli1 dans des fibroblastes, caractéristique de l'activation de la signalisation Hh (Pathi et al., 2001). Cependant, les 3 protéines recombinantes n'ont pas les mêmes capacités à induire l'activation des facteurs Gli, Shh possédant le plus fort potentiel activateur ( $Shh >> Ihh > Dhh$ ) (Chinchilla et al., 2010; Pathi et al., 2001).



## Synthèse des protéines Hh

La protéine Hh est traduite sous forme de précurseur de 45kDa. Lors de son transport à travers l'appareil de Golgi, elle subit un clivage auto-protéolytique catalysé par la partie C-terminale de la protéine, entraînant la production de deux fragments. Un peptide Shh-N, de 19kDa, responsable de l'activité de signalisation, est modifié en C-terminus par l'ajout d'un cholestérol (Porter et al., 1996). Ce peptide N-term subit ensuite l'ajout d'un palmitate sur le résidu cystéine à l'extrémité N-terminale, catalysé par une acyltransférase Ski (SKIIny Hedgehog) chez la drosophile (Pepinsky et al., 1998) dont HhAT (Hedgehog acyltransferase) est l'homologue chez les vertébrés. Le peptide Shh-C qui ne possède pas d'activité de signalisation est dirigé vers le protéasome et dégradé (Figure 16). Ihh serait également palmitoylée, suggérant que la palmitoylation est une modification post-traductionnelle commune entre les ligands Hh (Pepinsky et al., 1998).



**Figure 16 : Du précurseur à la protéine mature Hh sécrétée.** Après sa traduction, et après clivage du peptide signal, Shh subit un clivage autoprotéolytique catalysé par la partie C-term de la protéine, qui possède une activité de type « intéine ». Le domaine C-term catalyse le recrutement intramoléculaire d'un groupement de cholestérol. Cette réaction entraîne la séparation de la protéine en deux fragments. Le peptide N-term, Shh-N, responsable de l'activité de signalisation et lié de manière covalente en C-term par un cholestérol, subit ensuite l'ajout d'un palmitate sur le résidu cystéine en N-term.

L'addition de lipides n'est pas restreint aux protéines Hh, les protéines des familles Wingless et Notch sont palmitoylées (pour revue (Thérond, 2012)). Cependant, le morphogène Hh est la seule protéine sécrétée connue, liée de manière covalente à un cholestérol, la rendant particulièrement hydrophobe.

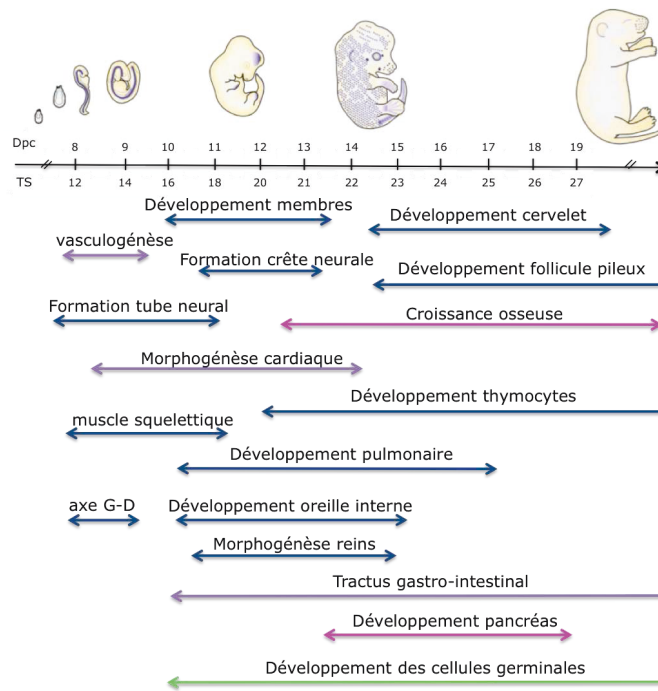
Bien que les voies de sécrétion de Hh ne soient pas encore totalement caractérisées (cf 3.2.1), ces modifications lipidiques jouent plusieurs rôles majeurs dans la régulation de l'adressage cellulaire du morphogène. Tout d'abord, lors de son trafic vésiculaire de

l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire, les protéines Hh forment un complexe avec la cavéoline-1, protéine de structure des cavéoles (Mao et al., 2009). Cette interaction pourrait permettre le ciblage des protéines Hh vers les radeaux lipidiques, microdomaines lipidiques membranaires où celles-ci sont enrichies (Chen, 2004). Le cholestérol permet également de maintenir la protéine à la surface cellulaire, sur la face externe de la membrane plasmique, rendant alors possible une activation Hh juxtacrine dans les cellules environnantes (pour revue (Gallet, 2011)). Le palmitate, est quant à lui l'AG majoritairement associé à Shh. Néanmoins, une étude récente a démontré que le morphogène Shh pouvait être modifié par différents types d'acides gras saturés ou insaturés capables de moduler de manière différentielle l'activité du morphogène (Long et al., 2015). Ces modifications lipidiques seraient fonction de la composition cellulaire en AG ou de l'environnement cellulaire nutritionnel (Long et al., 2015).

La fonction de ces modifications lipidiques a été étudiée à l'aide de mutants des protéines Shh qui ne pouvaient pas être lipidés (Chen, 2004; Grover et al., 2011; Long et al., 2015; Nakamura et al., 1997; Pepinsky et al., 1998). De nombreux travaux ont ainsi révélé que l'ajout de cholestérol (Gallet et al., 2003, 2006; Lewis et al., 2001) et de palmitate (Chamoun et al., 2001; Cooper et al., 2003; Goetz et al., 2006) sont indispensables à une diffusion sur longue-distance du morphogène et à son activité de ligand.

#### **b) Importance de la signalisation Hh au cours de l'embryogenèse**

La signalisation Hh intervient dès les premiers jours du développement embryonnaire et engendre des réponses cellulaires et moléculaires différentes selon un gradient de concentration à courte ou longue distance. Notamment, la signalisation Hh régule l'apparition de la polarité dorso-ventrale du tube neural, le développement du système nerveux central, la mise en place de l'axe antéro-postérieur et l'asymétrie droite-gauche des membres (Figure 17) (pour revue (McMahon et al., 2003)). L'importance de cette voie Hh est illustrée par la gravité des malformations du développement associées à une perte de fonction des protéines Hh: cyclopie, holoprosencéphalie, polydactylie, malformations crâniennes et squelettiques, retard mental (Chiang et al., 1996; Hill et al., 2003; Muenke and Beachy, 2000; Zhang et al., 2006). Les protéines Hh peuvent avoir des fonctions redondantes au cours de l'embryogénèse ou ciblées. Ainsi, Ihh intervient principalement dans la formation du tissu osseux et du cartilage tandis que Dhh est impliquée majoritairement dans la maturation des cellules germinales (pour revue (Ingham and McMahon, 2001)) (Figure 17).



**Figure 17 : La voie Hh intervient à divers stades au cours de l'embryogénèse.** Le stade embryonnaire approximatif des souris est indiqué en jours post conception (dpc) ou selon les stades de Theiler (TS) (en bleu: Shh, en rose: Ihh, en violet: Ihh + Shh, en vert: Dhh). En haut est représentée en bleu l'expression de Ptch-1 au cours de l'embryogénèse. En bas, quelques exemples de régulation au cours du développement contrôlés par les ligands Hh, Shh, Ihh et Dhh dans les tissus ou types cellulaires indiqués. Adapté de: Varjosalo and Taipale, *Genes Dev*, 2008.

### c) Importance de la signalisation Hh chez l'adulte

La signalisation Hh contrôle l'engagement des cellules mésenchymateuses vers le lignage adipocytaire (cf 3.3.1), ostéoblastique ou encore chondrocytaire et constitue avec d'autres morphogènes comme Wnt des facteurs contrôlant la balance entre ces différents lignages. Hh participerait aussi à la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques, en lien avec l'expression de ce morphogène dans les cellules stromales du thymus (Outram et al., 2000). Ce morphogène a aussi été impliqué dans les processus de réparations tissulaires en stimulant l'angiogénèse et la néovascularisation des tissus ischémiés, l'entretien et la différenciation des cellules souches (pour revue (Hooper and Scott, 2005)). Enfin, plusieurs données récentes suggèrent que la voie Hh modulerait le processus d'autophagie (Gagné-Sansfaçon et al., 2014; Jimenez-Sanchez et al., 2012) notamment par une interaction fonctionnelle entre Hh et le cil primaire (Pampliega et al., 2013).

L'importance de la signalisation Hh chez les vertébrés à l'âge adulte est illustrée par l'apparition de cancers dans de nombreux tissus (pancréas, sein, prostate, tractus gastro-intestinal, peau, cerveau) associés à une activation de la voie de signalisation Hh dans différents tissus (pour revue (Scales and de Sauvage, 2009)).

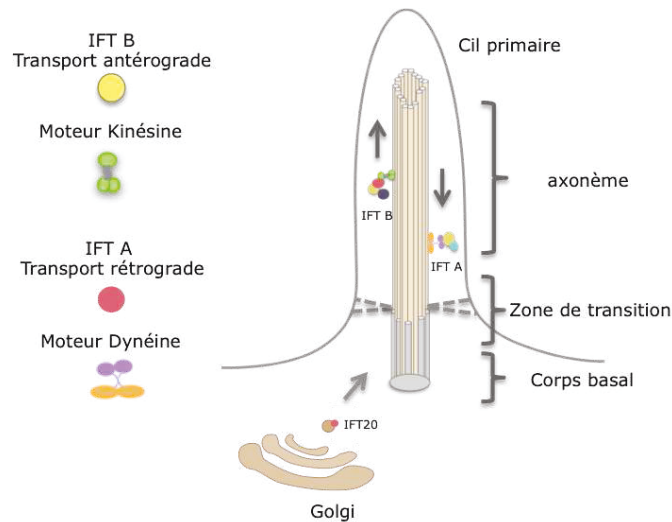
### 3.1.2. Les acteurs moléculaires de la signalisation Hh

#### a) Le cil primaire

##### Structure

Chez les vertébrés, la voie Hh canonique, est intégrée au niveau du cil primaire. Le cil primaire est un organe membranaire sensoriel non mobile, contrairement au flagelle, sur la surface cellulaire (pour revue (Goetz and Anderson, 2010; Ishikawa and Marshall, 2011)). Il est présent sur la face apicale des cellules polarisées chez la plupart des cellules de mammifères. Cet organe est composé du corps basal, de la zone de transition et de l'axonème (Figure 18). Le corps basal qui relie le cil à la cellule, concentre notamment des protéines BBS (Bardet Biedl Syndrome) formant le BBSome qui participe au trafic vésiculaire et au tri des protéines ciliaires (Nachury et al., 2007). La mutation de ces protéines induit des altérations fonctionnelles du cil conduisant à des ciliopathies (Ansley et al., 2003; Zhang et al., 2012). La zone de transition jouxtant le corps basal constitue une barrière sélective contrôlant le trafic des protéines ciliaires. Enfin, l'axonème se compose de 9 doublets de microtubules (Figure 18). Le transport de protéines le long de l'axonème est réalisé *via* un système de transport intra-flagellaire antérograde IFTA (vers la pointe du cil) et rétrograde, IFT B. Ces systèmes de transport sont associées à des protéines motrices : kinésine ou dynéine respectivement. Les protéines IFT participent au trafic vésiculaire des protéines ciliaires qui sont transportées de l'appareil de Golgi vers la membrane ciliaire. Finalement, plus de 600 protéines composent le cil primaire et participent à son fonctionnement. Le cil primaire concentre dans chaque doublet de microtubules, des tubulines acétylées. Cette modification post-traductionnelle est fortement enrichie dans l'axonème et permet, en imagerie, de déterminer la présence d'un cil primaire (Poole et al., 1997).

La formation du cil primaire est étroitement liée au cycle cellulaire. Le cil apparaît à la confluence cellulaire lorsque les cellules sont en phase G0-G1 et est désassemblé lors de l'entrée en mitose. Les mécanismes moléculaires intervenant dans le désassemblage du cil primaire ne sont pas encore totalement caractérisés. Néanmoins, le désassemblage peut se produire à la base du cil par un clivage des microtubules entre le corps basal et la zone de transition catalysé par les ATPases katanines ou des tubulines déacétylases (pour revue (Ishikawa and Marshall, 2011)). Enfin, le désassemblage du cil primaire pourrait être réalisé *via* une dégradation des protéines ciliaires par autophagie (Pampliega et al., 2013).

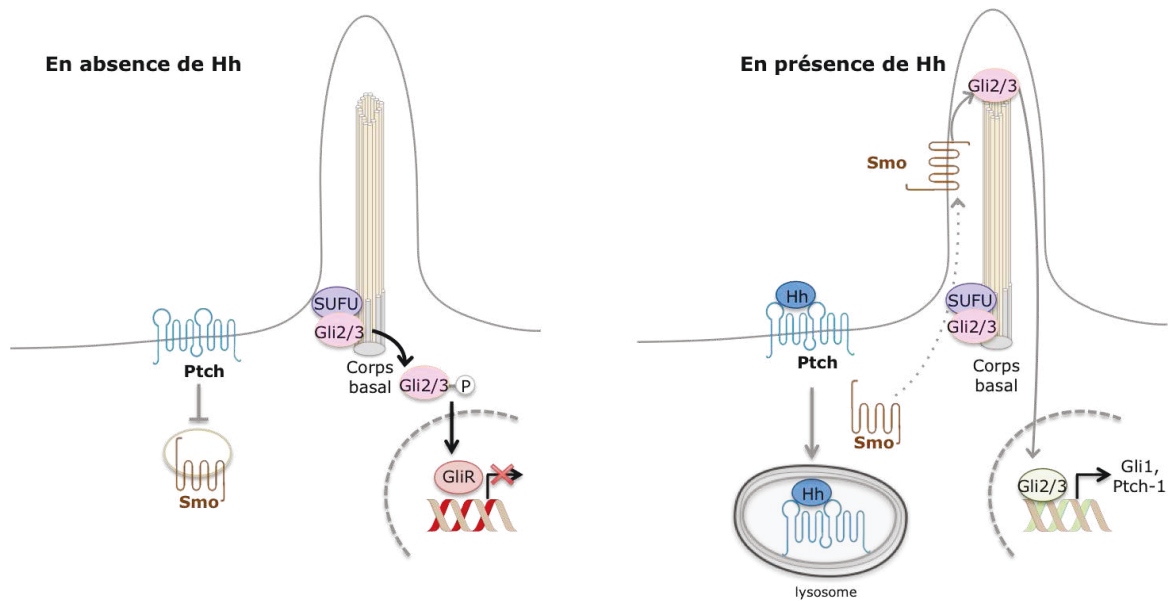


**Figure 18 : Structure du cil primaire.** Le cil primaire est composé de l'axonème, de la zone de transition et du corps basal. Les protéines sont transportées de la base vers la pointe du cil le long de l'axonème grâce au moteur kinésine 2 associé au complexe protéique de transport IFT (Intraflagellar transport). Le moteur dynéine module le retour des protéines vers la base du cil.

### Intégration de la voie de signalisation Hh au niveau du cil primaire

Ce cil primaire est présent à l'état préadipocytaire (Marion et al., 2009) mais disparaît dans des adipocytes différenciés (Marion et al., 2009; Forcioli-Conti et al., 2015; Zhu et al., 2009). En absence du ligand Hh, le récepteur Ptch est enrichi à la base et le long de l'axonème du cil primaire (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007) (Figure 19) et inhibe l'activation de Smo. Les protéines Gli, à la base du cil (Goetz and Anderson, 2010), sont séquestrées par un régulateur négatif de la voie Hh, SUFU (Suppressor of Fused), puis phosphorylées et clivées en une forme répresseur de la transcription, GliR. La liaison de Shh à Ptch entraîne l'inactivation de Ptch, l'internalisation et la dégradation du complexe Hh-Ptch dans les lysosomes. L'inactivation de Ptch libère Smo qui s'accumule dans le cil primaire (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007) qui peut être mimée par l'utilisation d'agonistes de Smo (Wang et al., 2009, 2012a; Wilson et al., 2009). Cette translocation de Smo dans le cil permet de stabiliser les facteurs Gli. Ceux-ci transloquent alors vers le noyau où ils pourront induire l'expression de leurs gènes cibles, en particulier, Gli1 (Lee et al., 1997) et Ptch (Marigo and Tabin, 1996).

L'absence de certains composants du trafic intra-flagellaire tels que kif3A, sous-unité du moteur kinésine, ou Polaris (homologue murin de IFT 88), est associée à une inhibition de la signalisation Hh au cours de l'embryogénèse démontrant l'importance d'un cil fonctionnel pour la transduction du signal Hh (Huangfu et al., 2003) (Figure 19). Enfin, la mutation des protéines du corps basal du cil primaire, EVC1 et 2 (Ellis Van Creveld syndrome protein), affecte la régulation de la voie Ihh et est associée à de graves malformations squelettique (Ruiz-Perez et al., 2000).

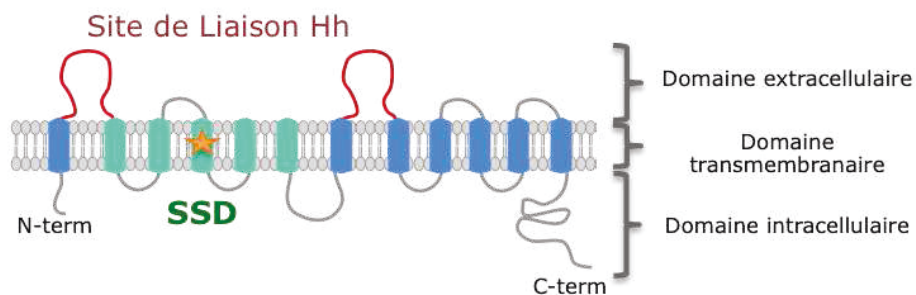


**Figure 19 : La signalisation Hh canonique est intégrée au niveau du cil primaire.**

Le cil a longtemps été considéré comme le site d'intégration de la voie Hh uniquement chez les vertébrés. La découverte récente de cellules sensorielles neuronales des antennes de *Drosophila melanogaster* ciliées suggère que, chez la drosophile, en fonction du type cellulaire, une signalisation dépendante ou indépendante du cil puisse exister (Kuzhandaivel et al., 2014).

### b) Le récepteur transmembranaire Patched (Ptch)

Patched (Ptch) est un récepteur à 12 domaines transmembranaires et possède un domaine SSD (sterol sensing domain) (Figure 20). Ce récepteur est particulièrement enrichi au niveau des radeaux lipidiques (Karpen et al., 2001).



**Figure 20 : Structure du récepteur transmembranaire Ptch.** Ptch est un récepteur transmembranaire de 142 kDa constitué de 12 domaines transmembranaires et deux boucles transmembranaires nécessaires pour la liaison à Hh. Le domaine SSD de Ptch est indispensable à son activité inhibitrice. Des mutations ★ dans le domaine SSD retrouvées chez les patients souffrant du syndrome de Gorlin sont associées à une perte de l'activité inhibitrice de ce récepteur (Taipale et al., 2002).

Chez les vertébrés, il existe 2 orthologues de Patched, Ptch-1 et Ptch-2, qui semblent avoir des rôles distincts (pour revue (McMahon, 2000)). Cependant, c'est le rôle de Ptch-1 (communément appelé Ptch) qui est le plus étudié dans la signalisation Hh.

La limite de diffusion des ligands Hh est atteinte lorsque les protéines Hh lie le récepteur Ptch qui séquestre le morphogène. D'une part, la liaison des protéines Hh au niveau des 2 boucles extracellulaires de Ptch (Briscoe and Ericson, 2001) entraîne la libération d'un autre acteur majeur de la signalisation Hh, le récepteur Smo, qui va stabiliser les facteurs de transcription Gli. Ces facteurs s'accumulent dans le noyau et régulent la transcription de leur gènes cibles. En particulier, les facteurs Gli induisent l'expression de Gli1 et Ptch (Figure 20).

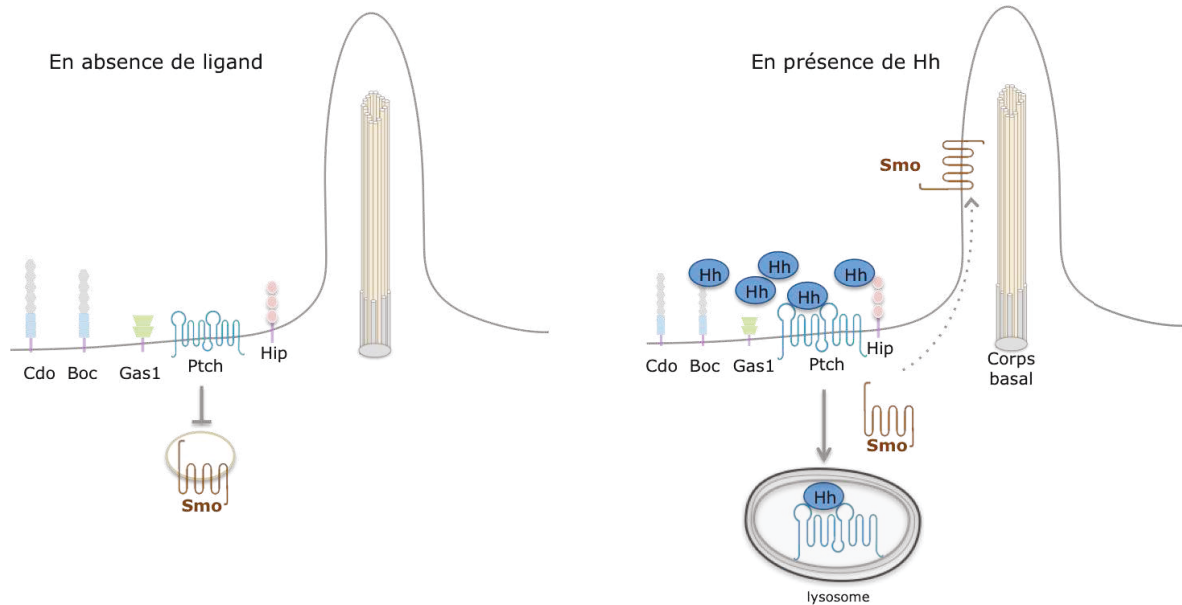
En absence des ligands Hh, Ptch est concentré à la base et dans le cil primaire (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007) et inhibe l'activation de Smo. Ainsi, des mutations perte de fonction de Ptch (Hahn et al., 1996; Johnstone, 2006) entraînent une activation constitutive de Smo et sont associées à des cancers de la peau (pour revue (Amakye et al., 2013)). Les mécanismes par lesquels Ptch inhibe Smo sont encore mal caractérisés. Il semblerait cependant que Ptch agirait de manière catalytique plutôt que stoechiométrique pour inactiver Smo, en faveur d'un modèle d'interaction indirecte entre Ptch et Smo (Taipale et al., 2002). Dans les cellules de mammifères, les protéines Ptch et Smo trafiquent en continu et de manière conjointe de la membrane plasmique vers des endosomes tardifs (Incardona et al., 2000). Chez le mutant Smo-M1, constitutivement actif, la co-localisation Ptch/Smo est perdue (Incardona et al., 2002). Il en est de même en présence de ligand Hh (Incardona et al., 2002). Ceci suggère donc que Ptch régulerait le trafic vésiculaire de Smo.

Le domaine SSD de Ptch jouerait un rôle dans le contrôle de l'activité de Smo. En effet, l'activité inhibitrice de Ptch est perdue lorsque ce SSD est muté, comme c'est le cas chez les patients souffrant du syndrome de Gorlin (Taipale et al., 2002), cancer de la peau associé à une activation constitutive de la signalisation Hh (Figure 20). En outre, les mutations ponctuelles du SSD ne modifient pas la capacité du récepteur Ptch à séquestrer les protéines Hh (Callejo et al., 2008; Martín et al., 2001; Strutt et al., 2001). Chez la drosophile, ce SSD a été impliqué dans le trafic vésiculaire de lipides dérivées des lipoprotéines, qui pourraient agir comme des ligands naturels de Smo (Callejo et al., 2008; Khaliullina et al., 2009). Dans des cellules de mammifères, l'accumulation de Smo à la membrane peut être modulée par les concentrations intracellulaires de cholestérol ou de phospholipides PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate) (Bidet et al., 2011; Yavari et al., 2010).

Enfin, la partie C-term de Ptch jouerait également un rôle dans le contrôle de la signalisation Hh au cours de l'embryogénèse chez la drosophile (Johnson et al., 2000; Strutt et al., 2001) et la souris (Makino et al., 2001), et dans l'activation et la localisation

cellulaire de Smo (Johnson et al., 2000; Lu et al., 2006).

Le complexe Hh-Ptch est ensuite internalisé pour être dégradé dans les lysosomes (Incardona et al., 2000). Cette internalisation utiliserait une voie classique d'endocytose dépendante de la clathrine et de la dynamine (Torroja et al., 2004). Cependant, une voie d'internalisation d'Hh indépendante de Ptch a aussi été décrite (Torroja et al., 2004).



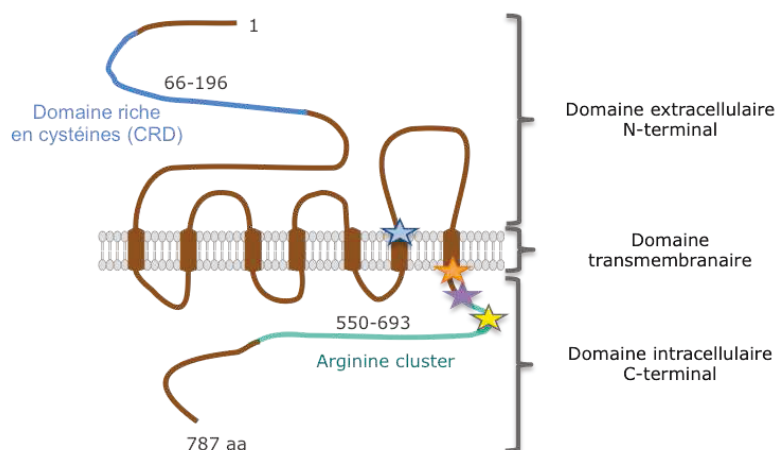
**Figure 21 : Les co-récepteurs des morphogènes Hh.** L'interaction entre Ptch est facilitée par des co-récepteurs Gas1, Cdo, Boc. En revanche la glycoprotéine Hip entre en compétition avec Ptch et limite le signal Hh.

L'interaction entre les ligands Hh et Ptch pourrait être facilitée par l'action de co-récepteurs incluant Cdo (Cell adhesion molecule-related downregulated by oncogenes), Boc (Brother of cdo) (Tenzen et al., 2006) et Gas1 (growth arrest specific 1) (Del Sal et al., 1992) (Figure 21). Enfin, Hip (Hedgehog Interacting Protein), glycoprotéine associée à la membrane, constitue un autre récepteur des protéines Hh (Chuang and McMahon, 1999). Hip et Ptch entreraient en compétition pour la liaison des protéines Hh (Maun et al., 2010) (Figure 21). Hip agit donc comme co-répresseur de la voie Hh et limite l'activation du signal (Chuang and McMahon, 1999; McLellan et al., 2008). Son expression est de plus induite lors de l'activation de la voie de signalisation Hh comme Ptch (Chuang and McMahon, 1999).



### c) Smoothened

Smoothened (Smo), un des acteurs majeur de la transduction du signal, est apparenté aux GPCR (G-protein Coupled Receptor) et présente de fortes homologues de structure avec un autre GPCR, Frizzled, récepteur transmembranaire des ligands Wnt (pour revue (Ayers and Théron, 2010)).



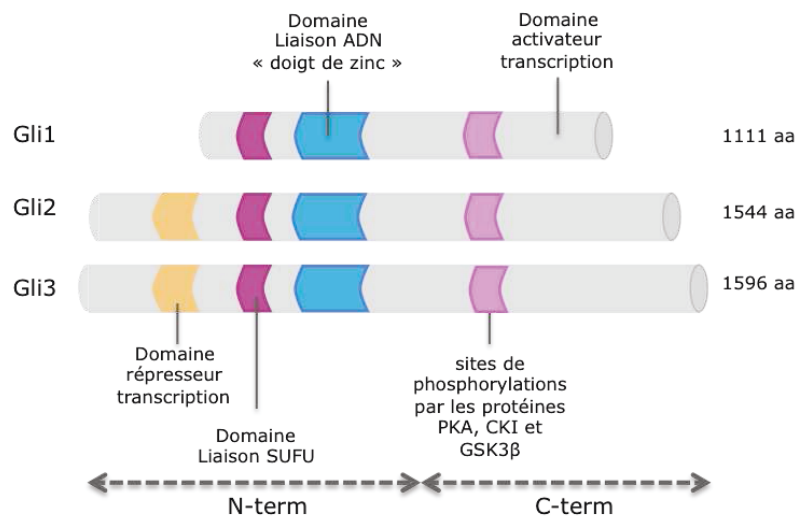
**Figure 22 : Structure du récepteur transmembranaire Smoothened.** Apparenté à la famille des GPCR, Smo possède un domaine N-terminal extracellulaire contenant un cluster de cystéines, le CRD, un domaine à 7 boucles transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Sur le schéma sont représentés par des étoiles, les mutations retrouvées chez les patients atteints de carcinome baso-cellulaire et qui sont associées à une activation constitutive de Smo et par conséquent la voie Hh. (★ Smo-473 : mutation de la sérine 473 responsable de la résistance à GDC-0449; ★ Smo-M1: remplacement de la glutamine (aa 562) par un résidu arginine; ★ Smo-M2: remplacement d'un tryptophane par une leucine (aa 535); ★ Smo-A2: mutation de la sérine 533).

En effet, Smo possède un CRD (cystein rich domain), domaine N-terminal extracellulaire riche en cystéines, 7 domaines transmembranaires et enfin, un domaine intracellulaire C-terminal (Figure 22). Bien que plusieurs éléments *in vitro* suggèrent que Smo puisse activer des protéines G $\alpha$ i (DeCamp et al., 2000; Riobo et al., 2006), la transduction du signal Hh *via* un couplage de Smo aux protéines G est à confirmer. Les 3 domaines de Smo sont nécessaires à son activité. Tout d'abord, son CRD est indispensable à l'activation de la signalisation Hh (Carroll et al., 2012; Nachtergaele et al., 2013; Rana et al., 2013). Bien qu'aucun ligand endogène de Smo n'ait été identifié, il a été décrit que certains oxystéroïdes lieraient ce CRD (Nedelcu et al., 2013; Rana et al., 2013). Un autre domaine clé dans l'activation de Smo est son domaine transmembranaire, qui lie la plupart des modulateurs de Smo (pour revue (Ruat et al., 2014)). Plusieurs mutations somatiques, activatrices, au niveau des boucles transmembranaires de Smo ou dans sa partie C terminale ont été identifiées chez des patients souffrant de carcinome baso-cellulaire (BCC), le cancer de la peau le plus fréquent (Figure 22). En absence du ligand Hh, bien qu'un pool de Smo inactif trafique continuellement vers le cil primaire (Kim et

al., 2014; Milenkovic et al., 2009), la majorité des protéines Smo inactives seraient associées aux endosomes (Incardona et al., 2002). La liaison de Hh à Ptch entraîne l'accumulation de Smo dans le cil primaire où il pourra stabiliser les facteurs de transcription Gli (Figure 19).

#### d) Les facteurs de transcription Gli

Les facteurs Gli (Gli1, Gli2 et Gli3), codés par trois gènes différents, vont transduire le signal Hh par l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes. Gli1 est un activateur de la transcription, alors que Gli2 et 3 peuvent agir comme activateur (Gli2/3A) ou répresseur (Gli2/3R). Ceci est dû à la présence d'un domaine répresseur dans la partie N-terminale de Gli2/3 absent chez Gli1 (Sasaki et al., 1999) (Figure 23).



**Figure 23 : Structure des facteurs de transcription Gli.** Contrairement à Gli1, Gli2 et 3 possèdent un domaine répresseur en N-terminal. Ils peuvent être à la fois activateur (forme entière) ou inhibiteur (forme clivée, sans la partie C-terminale) de la transcription.

En absence de Hh, les facteurs Gli forment un complexe avec la protéine SUFU (Humke et al., 2010), régulateur négatif de la signalisation Hh. Ces facteurs vont alors être phosphorylés dans leur partie C-terminale par les kinases PKA (protéine Kinase A) (Pan et al., 2009) puis par GSK3β (Glycogen synthase kinase 3β) (Kise et al., 2009) et CK1 (Casein Kinase-1) (Price and Kalderon, 2002). Ces protéines phosphorylées sont ensuite reconnues par l'ubiquitine ligase β-TrCP (Tempé et al., 2006). Les protéines ainsi ubiquitinylées sont ciblées vers le protéasome et leur partie C-terminale est clivée (Smelkinson and Kalderon, 2006). Les formes répressives Gli2/3R transloquent dans le noyau pour réprimer l'expression de leurs gènes cibles alors que les protéines Gli1 sont dégradées. En présence du morphogène Hh, les protéines Gli sont stabilisées (Pan et al., 2006) et transloquent dans le noyau. L'activation des facteurs de transcription Gli conduit à l'induction de l'expression des acteurs de la signalisation Hh ainsi que des protéines

régulant la prolifération cellulaire (cyclines et oncogènes c-Myc), l'apoptose (Bcl-2), le renouvellement et la différenciation cellulaire (pour revue (di Magliano and Hebrok, 2003)).

## 3.2. Régulation de la signalisation Hh

Après leur libération, le champ d'action des protéines Hh dans les tissus atteindrait un rayon d'environ 50µm chez la drosophile et d'environ 300µm chez les vertébrés (pour revue (Ingham et al., 2011)). La régulation de la signalisation Hh va dépendre des modes de sécrétion et de diffusion de ce morphogène. Bien que la forme recombinante, non lipidée soit capable de lier Ptch et activer la signalisation Hh *in vitro* (Nakamura et al., 1997), la forme biologique de Shh serait essentiellement sous forme lipidée (Pepinsky et al., 1998). Enfin, Hh peut diffuser soit librement, soit associé en complexe avec des protéines ou vésicules membranaires.

### 3.2.1. Diffusion et formation du gradient de ligand Hh

#### a) Libération d'un morphogène hydrophobe

Les modifications lipidiques covalentes des protéines Hh ancrent le morphogène à la membrane plasmique. A la surface membranaire, les formes matures lipidées du morphogène Hh forment des oligomères (100 à 700 kDa) (pour revue (Eaton, 2008; Gallet, 2011)). Cette organisation serait nécessaire pour une activité maximale du morphogène et favoriseraient la formation de structures micellaires, avec les ajouts cholestérol dirigés vers l'intérieur.

La libération des protéines Hh, hydrophobes et membranaires, nécessite l'action conjointe de deux protéines, Dispatched (Disp) (Burke et al., 1999) et SCUBE (Signal-peptide, CUB domain, epidermal growth factor-like (EGF-like)), qui vont reconnaître le cholestérol des protéines Hh et coopérer afin de faciliter la sécrétion et la solubilité de la forme Hh (Tukachinsky et al., 2012). Enfin, des métalloprotéases telles que ADAM17 participeraient aussi à la libération des protéines Hh (Dierker et al., 2009). Les protéoglycanes co-localisent à la surface cellulaire avec les oligomère de Shh (Vyas et al., 2008) et participeraient également à la libération et la diffusion du morphogène (Ayers et al., 2010; The et al., 1999).

#### b) Diffusion du morphogène

L'oligomérisation d'Hh apparaît comme un pré-requis à la formation de clusters membranaires visibles chez la drosophile, détectés par microscopie optique (Vyas et al., 2008). Ces oligomères, dont la formation dépend en partie du palmitate et du cholestérol (Chen, 2004; Shi et al., 2013), participeraient à la diffusion du morphogène (Zeng et al., 2001). Par ailleurs, de grosses particules contenant Hh ont été détectées à la fois dans les cellules sécrétrices et les cellules cibles de la signalisation Hh *in vivo* chez la drosophile (Gallet et al., 2003). La nature exacte de ces grosses vésicules reste à

déterminer. Parallèlement, plusieurs études ont identifiées Hh associé à des lipoprotéines ou à des vésicules extracellulaires (Figure 24).

### **Transport d'Hh associé aux lipoprotéines**

Un transport d'Hh *via* une association aux lipoprotéines a été mis en évidence à la fois chez la drosophile (Panáková et al., 2005) et chez les cellules de mammifères (Palm et al., 2013). En accord avec ces données, la diminution de lipoprotéines dans l'hémolymphe par RNA interférence contre apolipoprotéine II, affecte la diffusion du morphogène (Callejo et al., 2008; Panáková et al., 2005). Le récepteur Ptch est de plus capable de séquestrer et internaliser des lipoprotéines (Callejo et al., 2008; Khaliullina et al., 2009). Chez les vertébrés, le palmitate et le cholestérol sont nécessaires pour l'association de Shh aux petites lipoprotéines de type LDL (Palm et al., 2013). De surcroît, les formes matures de Shh sont de plus capables de lier le récepteur aux LDL, LRP2 ou Megalin, conduisant à l'endocytose du morphogène (McCarthy et al., 2002).

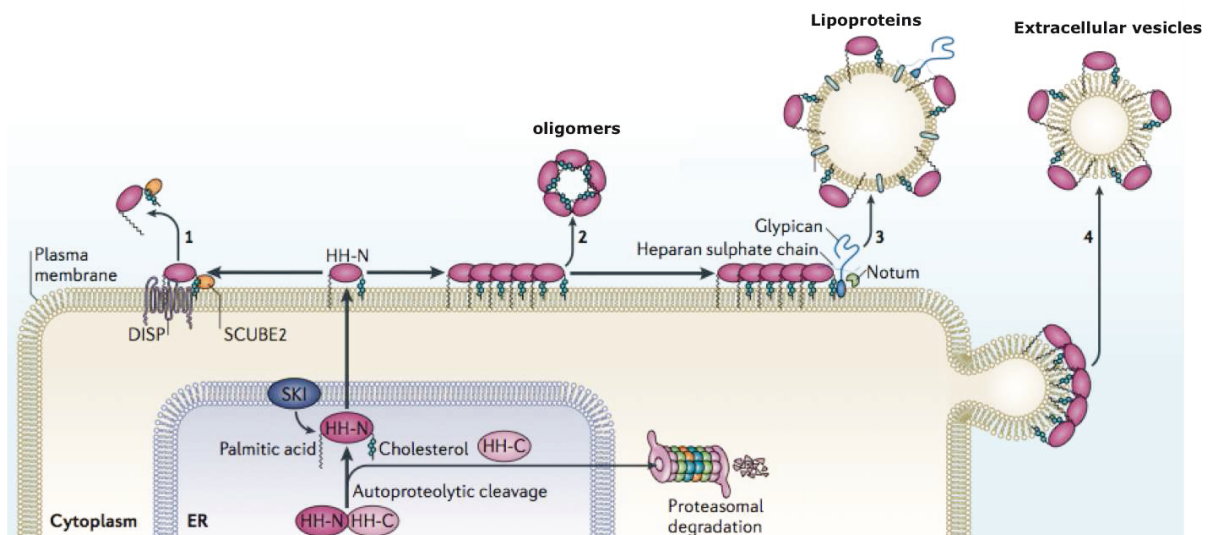
### **Transport d'Hh associé vésicules extracellulaires**

Hh a été retrouvé associé à des VE isolés soit de surnageant cellulaires *in vitro* (Mackie et al., 2012; Matusek et al., 2014; Vyas et al., 2014; Witek et al., 2009) mais aussi *in vivo* à partir d'hémolymphe de drosophile (Tanaka et al., 2005) ou de plasma humain (Martínez et al., 2006). Hh est retrouvé à la fois sur des populations exosomales de petite taille (Vyas et al., 2014) et de MP de plus grosse taille (Witek et al., 2009; Martínez et al., 2006).

L'adressage des protéines Hh à ces VE est lié à la présence de certains stimuli. En effet, dans des lymphocytes, la combinaison d'agents pro-activateurs et pro-apoptotique induit le relargage spécifique de MP Hh-positives contrairement à une stimulation apoptotique seule (Martínez et al., 2006). De manière analogue, le PDGF-BB (Platelet derived growth factor BB) induit la sécrétion de MP portant Hh par des cellules hépatiques stellaires (Witek et al., 2009). Cet adressage spécifique aux MP hépatiques est lié à une induction de l'expression hépatocytaire de Shh et Ihh en réponse au PDGF-BB (Witek et al., 2009; Yao et al., 2014).

Les VE Hh<sup>+</sup>, isolées à partir de la lignée cellulaire épithéliale CI8, possèdent aussi des composants du ESCRT à leur surface (Matusek et al., 2014), ces dernières pouvant favoriser la production de VE Hh<sup>+</sup> en modulant le bourgeonnement membranaire.

Enfin, une même cellule peut produire à la fois le morphogène sous sa forme monomérique ou associée aux VE suggérant l'existence conjointe des deux modes de production (Vyas et al., 2014).



**Figure 24 : Mécanismes de diffusion du morphogène Hh.** Les protéines Shh s'organisent sous forme d'oligomères à la membrane plasmique. Ce morphogène peut diffuser sous différentes formes dans le milieu extracellulaire : (1) sous forme monomérique, (2) sous forme d'oligomères dérivés de la membrane, (3) capté par les lipoprotéines circulantes ou (3) associé aux VE. Adapté de (Briscoe and Théron, 2013).

### c) Formation du gradient de diffusion

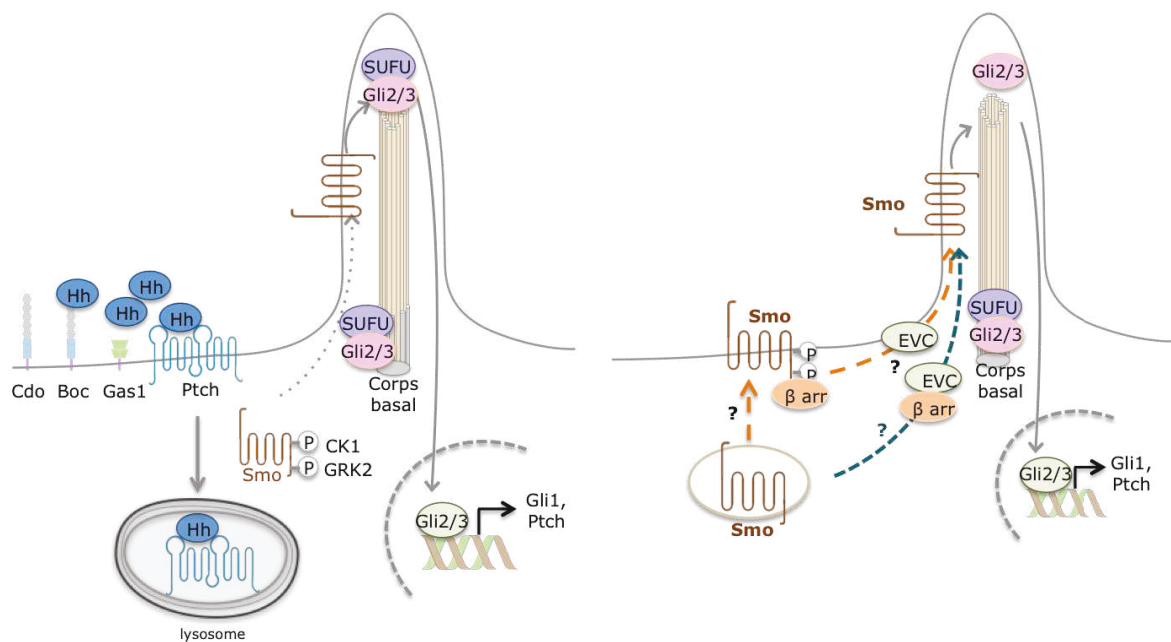
Chez la drosophile, la sécrétion de Hh sur la face apicale des cellules épithéliales serait associée à la signalisation Hh à distance tandis que la sécrétion du morphogène sur la face basale serait plutôt responsable d'effets juxtacrines (Gallet et al., 2003). Disp interviendrait dans la sécrétion des protéines Hh de la face apicale vers la face basolatérale (Callejo et al., 2011). Enfin, Disp participe aussi à la formation d'un gradient Hh, en régulant la ré-internalisation du morphogène par endocytose après sa sécrétion (D'Angelo et al., 2015). Cette ré-internalisation précéderait la sortie *via* la voie endo-lysosomale et sa sécrétion à la surface de VE (D'Angelo et al., 2015).

## 3.2.2. Transduction du signal Hh

### a) La voie canonique

La liaison de Hh à Ptch entraîne l'accumulation de Smo à la membrane. La phosphorylation de résidus Ser/Thr de la partie C-term de Smo par GRK2 (G protein-coupled Receptor Kinase-2) (Meloni et al., 2006; Chen et al., 2004) et CK1 $\alpha$  (Casein Kinase 1  $\alpha$ ) (Chen et al., 2011) entraîne un changement de conformation de ce récepteur « fermée à ouverte », et son association avec  $\beta$ arrestin-2 et KIF3A conduisant à son accumulation dans le cil primaire (Figure 25) (Kovacs et al., 2008; Zhao et al., 2007). Smo interagit également avec les protéines EVC, qui participent au trafic ciliaire de ce récepteur (Dorn et al., 2012). Néanmoins, les mécanismes moléculaires par lesquels Smo trafique vers le cil primaire sont mal connus (Figure 25). L'accumulation de Smo ciliaire entraîne une dissociation des complexes Gli-SUFU (Tukachinsky et al., 2010). Ces Gli transloquent ensuite dans le noyau *via* le transport rétrograde IFT, sous

leur forme activatrice de la transcription (Haycraft et al., 2005). Le mécanisme par lequel Smo induit la dissociation du complexe Gli-SUFU reste à élucider (Figure 25).



**Figure 25 : Activation de Smo en présence des morphogènes Hh.** A gauche, la liaison de Hh à Ptch inactive les protéines Ptch et stabilise les protéines Smo. Le complexe Hh-Ptch est dégradé tandis que les protéines Smo phosphorylées s'accumulent dans le cil primaire. A droite, la translocation de Smo dans le cil primaire reste encore mal décrite. Cette translocation pourrait intervenir *via* un trafic direct de Smo endosomal vers le cil, ou serait un processus en deux étapes faisant intervenir un transfert latéral d'un Smo membranaire vers la membrane ciliaire. L'accumulation de Smo dans le cil entraîne la dissociation du complexe SUFU/Gli et le transport des protéines Gli non clivées vers le noyau où elles pourront induire l'expression de leurs gènes cibles, en particulier, Gli1 et Ptch. Barr : βarrestin, EVC : Ellis Van Creufeld protéines, CK1 : casein Kinase 1, GRK2 : G protein-coupled Receptor Kinase-2.

### b) Signalisation Hh indépendante des facteurs de transcription Gli : voies non-canoniques

Plusieurs voies de signalisation Hh faisant intervenir Ptch et/ou Smo, mais indépendantes de l'activation des Gli, ont été décrites. Elles moduleraient plusieurs processus cellulaires. La signalisation Hh joue un rôle clé dans la réparation tissulaire notamment en régulant l'angiogénèse et la néovascularisation. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse angiogénique semblent impliquer à la fois des voies canoniques et non-canoniques de signalisation. Le traitement de cellules endothéliales humaines par la protéine recombinante Shh (Shh rec) est associé à la translocation nucléaire de Gli1 (Kanda et al., 2003). La formation de réseaux de capillaires *in vitro* peut être empêchée par un inhibiteur des facteurs Gli, GANT61 (Spek et al., 2010). *In vivo*, un défaut d'angiogénèse dans les tissus ischémiés de souris âgées est associé à une diminution de l'expression génique de Gli1 (Palladino et al., 2011; Renault et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère que l'angiogénèse régulée par la voie de

signalisation Hh est dépendante des facteurs Gli. Cependant, d'autres études démontrent que Shh rec induit la migration des fibroblastes, le remodelage du cytosquelette et la formation de capillaires par les cellules endothéliales *in vitro* via un axe non-canonique Smo-GTPases Rac1 et RhoA (Chinchilla et al., 2010; Polizio et al., 2011). Shh rec induit aussi l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que MMP-9, angiopoïétines 1 et 2 sans induire l'expression de Gli1 (Renault et al., 2010).

Un autre axe de signalisation non-canonique de Hh impliquant la protéine Ampk (Teperino et al., 2012) a été récemment décrit. L'Ampk, protéine majeure dans la régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire, est enrichie dans l'axonème et à la base du cil primaire (Teperino et al., 2012). La forme phosphorylée de l'Ampk est de plus enrichie à la base du cil primaire (Christopher Boehlke et al., 2010).

Dans des adipocytes matures (3T3-L1 différenciés *in vitro*), des agonistes classiques de la voie Hh (SAG (Smoothened AGonist), purmorphamine) entraînent une activation de l'Ampk, dépendante de Smo et est associée à l'activation des kinases Lkb1 et Camkk2, dont le substrat principal est l'Ampk (Teperino et al., 2012). L'injection de cyclopaïne à des souris se traduit aussi par une activation de l'Ampk (Teperino et al., 2012). L'activation de cet axe Hh/Smo/Ampk se traduit par une amélioration du profil glycémique des animaux, liée à une entrée de glucose accrue en réponse à l'insuline dans les adipocytes bruns et les cellules musculaires (Teperino et al., 2012). Enfin, de faibles concentrations d'antagonistes de Smo activent aussi cette voie Smo/Ampk dans les adipocytes et représenteraient par conséquent des agonistes partiels (Teperino et al., 2012).

### **3.2.3. Agents pharmacologiques modulant la signalisation Hh : les modulateurs de Smo**

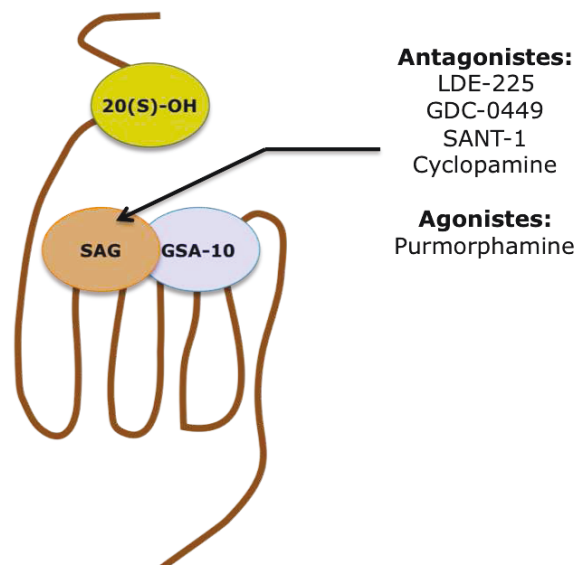
Différents agonistes ou antagonistes de Smo ont été identifiés par la mesure de l'activité transcriptionnelle des facteurs Gli (à partir de cellules «Shh-LIGHT2» couplant le promoteur Gli à un système rapporteur) ou bien basés sur leur capacité à induire ou inhiber la différenciation en ostéoblastes de cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2 (pour revue (Ruat et al., 2014)). Des méthodes alternatives consistant à cribler des molécules induisant l'accumulation de Smo dans le cil ont aussi été utilisées (Wang et al., 2012a). Néanmoins, la translocation de Smo dans le cil n'est pas toujours associée à une activation de la voie de signalisation Hh (Wilson et al., 2009).

Les agonistes de Smo classiquement utilisés sont le SAG, un benzothiophène, et son dérivé la purmorphamine (Wu et al., 2002) sont tous deux considérés comme des activateurs de la voie canonique Hh. Un autre agoniste, le GSA-10, une quinolinone, a récemment été décrit comme activant la signalisation Hh *via* Smo, mais indépendamment des facteurs Gli (Gorojankina et al., 2013).



La cyclopamine, alcaloïde stéroïde naturel dérivé de la plante *Veratrum californicum*, est la première molécule identifiée comme antagoniste de Smo (Keeler and Binns, 1968). La cyclopamine lie Smo, entraîne son accumulation dans le cil primaire mais inhibe son activation en le maintenant dans une configuration fermée (Wilson et al., 2009). Cependant, cette molécule est difficile à synthétiser en grande quantité et, par conséquent, ne peut pas être utilisée en thérapie (pour revue (di Magliano and Hebrok, 2003)). La synthèse d'un dérivé de la cyclopamine, 3-keto, N-aminoethyl aminocaproyl dihydrocin-namoyl cyclopamine (cyclopamine KAAD), plus puissante, pourrait potentiellement pallier ces difficultés (Taipale et al., 2000). La structure de la cyclopamine a inspiré le développement d'autres molécules antagonistes de Smo dont certaines sont actuellement utilisées dans le traitement de cancers BCC et médulloblastomes comme le GDC-0449 (Vismodegib, Genentech) et le LDE-225 (sonidegib, Novartis) ou comme les molécules SANT-1 à 4 (CalbioChem) utilisées en recherche (pour revue (Ruat et al., 2014)) (Figure 26).

Les différents modulateurs de l'activité de Smo peuvent être classés selon leur site de liaison à Smo (Figure 26). La plupart des modulateurs de Smo tels que la cyclopamine, le SAG et la purmorphamine, SANT-1, le GDC-0449 et le LDE-225 lient le récepteur au niveau des boucles transmembranaires (Hoch et al., 2015; Wang et al., 2014). Le site de liaison de cyclopamine et du SAG se chevauchent mais ne sont pas identiques (Chen et al., 2002). Le GSA-10 est capable d'inhiber la liaison du SAG et agirait alors comme modulateur allostérique négatif de cette poche de liaison à Smo (Gorojankina et al., 2013).



**Figure 26 : Sites de liaison des modulateurs de Smo.** La plupart des molécules régulant l'activité de Smo lient le récepteur au niveau des boucles transmembranaires, tandis que les oxystéroïls, en particulier, le 20(S)-OH lient Smo au niveau du CRD. Enfin, le GSA-10 un agoniste de la signalisation Hh non canonique lie Smo au niveau des boucles transmembranaires et agirait comme un modulateur allostérique négatif du SAG (Ruat et al., 2014).

La ressemblance structurale entre la cyclopatamine et les stérols a conduit à rechercher si Smo pouvait lier des lipides. Plusieurs oxystérols dont le 20-OH et la vitamine D3, ont été respectivement décrits comme agonistes ou antagonistes (Bijlsma et al., 2006) de la signalisation Hh, capables de lier le domaine CRD de Smo (Nachtergaele et al., 2012; Nedelcu et al., 2013). En particulier, le 20-OH agirait comme un activateur allostérique des agonistes de Smo, SAG et Purmorphamine (Nachtergaele et al., 2013). Enfin, chez la drosophile, les endocannabinoides circulants lient Smo et régulent négativement la signalisation Hh (Khaliullina et al., 2015).

### **3.3. Signalisation Hh et développement du tissu adipeux**

Le développement du TA est fonction de la différenciation de nouveaux adipocytes et de la capacité des adipocytes présents dans le TA à stocker les lipides. En modulant plusieurs processus du métabolisme adipocytaire, Hh apparaît comme un régulateur critique du développement du tissu adipeux.

#### **3.3.1. Contrôle de la différenciation adipocytaire par Hh**

Les préadipocytes 3T3-L1 ou les cellules souches humaines multipotentes, hASCs, peuvent répondre à la liaison des ligands Hh puisque ces cellules expriment Smo, le récepteur Ptch et les facteurs Gli (Fontaine et al., 2008). L'induction de la différenciation adipocytaire est associée à une diminution de l'expression de ces acteurs moléculaires (Fontaine et al., 2008; James et al., 2010; Suh et al., 2006). L'activation de la voie Hh chez la drosophile entraîne une inhibition de la formation du corps gras (« fat body »), tissu en charge du stockage des lipides chez cet insecte (Suh et al., 2006). Cette altération du stockage lipidique est conservée chez les mammifères comme en témoigne une inhibition totale de la différenciation adipocytaire de cellules 3T3-L1 suite au traitement par la protéine recombinante Shh rec ou par ajout d'un agoniste de Smo, le SAG (Suh et al., 2006). Cette inhibition de l'adipogenèse a été reproduite en utilisant d'autres activateurs de la voie Hh ou d'autres modèles de différenciation adipocytaire (Fontaine et al., 2008; Pospisilik et al., 2010; Todoric et al., 2011). Ce blocage serait lié à une inhibition des facteurs clés de l'adipogenèse, PPAR $\gamma$  et CEBP $\alpha$ , qui pourrait faire suite à l'activation des facteurs Gata2/3 (Suh et al., 2006).

Par ailleurs, près d'un gène sur trois (27%) intervenant dans la régulation de l'adipogenèse serait la cible de la signalisation Hedgehog, notamment Pref-1, BMP-2, BMP-4, CoupTFII ou Nr2f2 (Vokes et al., 2008). En accord avec ces données, une analyse *in silico* révèle que près de 50% des gènes de l'adipogenèse possèdent dans leur promoteur des sites de liaison des protéines Gli incluant les gènes Wnt, CEBP $\alpha$ , Gata2 et

GSK3 $\beta$  (Pospisilik et al., 2010).

Enfin, les glucocorticoïdes interfèrent avec la signalisation Hh comme en témoigne l'ajout de dexaméthasone qui rendent les cellules 3T3-L1 (Pospisilik et al., 2010) ou les préadipocytes primaires humains insensibles aux effets d'agonistes des protéines Hh (Forcioli-Conti et al., 2015; Todoric et al., 2011).

L'activation constitutive de la signalisation Hh spécifiquement dans le TA par la suppression de *Sufu* (Suppressor of Fused) entraîne une perte de 80% des dépôts de TA blanc, sans altérer le TA brun (Pospisilik et al., 2010). Néanmoins, l'implication de la signalisation Hh dans la différenciation adipocytaire brune reste controversée. Des travaux récents démontrent l'inhibition de la différenciation adipocytaire brune et de la formation du TA brun *in vivo* suite à l'activation de la signalisation Hh (Nosavanh et al., 2015). De plus, une diminution de la signalisation Hh *via* la délétion de *Boc* (Brother of CDO), est associée à une prise de poids significative liée à une augmentation de la masse des TA blancs et brun (Lee et al., 2015). Ceci suggère que la signalisation Hh est un puissant régulateur du développement des dépôts adipeux blancs et bruns.

A l'inverse, l'activation de la voie Hh dans des cellules mésenchymateuses pluripotentes va favoriser l'ostéogenèse comme en témoigne l'induction de l'expression de Runx2 (runt-related transcription factor 2), l'ostéocalcine ou encore la phosphatase alcaline, au dépend de l'adipogenèse (James et al., 2010; Spinella-Jaegle et al., 2001). L'expression du facteur Runx2 est par ailleurs induite dans des préadipocytes 3T3-L1 traités avec Shh rec (Suh et al., 2006). Chez l'homme, le rôle de la signalisation Hh dans la balance adipogenèse/ostéogenèse est moins évidente (James et al., 2012; Oliveira et al., 2012; Plaisant et al., 2009). Selon le modèle de cellules souches et le cocktail d'induction utilisés, l'activation de la signalisation Hh favorise (James et al., 2012; Oliveira et al., 2012) ou non (Plaisant et al., 2009) un engagement vers le lignage ostéoblastique.

### 3.3.2. Signalisation Hh dans un tissu adipeux adulte

L'expression génique de Gli1 est diminuée dans le tissu adipeux viscéral de patients obèses (Todoric et al., 2011). De même, dans le TA de souris obèses, soumises à un régime gras ou génétiquement obèses (*Ob/Ob*), l'expression des facteurs Gli et Smo est diminuée par rapport aux souris contrôles (Suh et al., 2006). Ces données suggèrent que l'augmentation de la masse adipeuse pourrait être associée à un défaut de signalisation Hh dans les adipocytes.

Une délétion de la partie C-term de Ptch, conduisant à une activation de la signalisation Hh, est associée à une diminution de l'expression des facteurs PPAR $\gamma$  et CEPB $\alpha$  dans le TA viscéral de souris adultes (Li et al., 2008). La taille des adipocytes et la masse du TA sont également fortement réduites mais n'entraînent aucune altération de l'insulino-sensibilité (Li et al., 2008). De manière analogue, l'activation de la signalisation Hh suite à

l'inactivation du gène *Sufu* conduit, elle aussi, à une diminution de la taille des adipocytes et une disparition de 80% de la masse de TA blanc (Pospisilik et al., 2010). Par ailleurs, l'inactivation de la signalisation Hh chez des souris adultes, *via* l'injection de l'anticorps bloquant 5<sup>E1</sup>, protège d'une prise de poids induite par un régime gras (Buhman et al., 2004). En revanche, l'injection en sous-cutanée d'une protéine Hh de fusion conduit à une augmentation du poids des souris liée à une augmentation de la masse adipeuse et de la surface du tissu osseux (Martin et al., 2002). Hh étant aussi impliqué dans la prolifération cellulaire, ce rôle pourrait interférer avec le développement du TA et expliquer ces résultats contradictoires.

### 3.3.3. Signalisation Hh et plasticité du TA

D'une part, l'activation de la signalisation Hh non-canonique Ampk-dépendante par la cyclopaamine *in vivo*, améliore la sensibilité à l'insuline et favorise l'entrée du glucose dans les adipocytes bruns et les cellules musculaires squelettiques (Teperino et al., 2012). D'autre part, l'activation de Hh dans le TA des souris *Sufu*<sup>-/-</sup> est associé à une induction de l'expression de la protéine UCP-1, cible de l'Ampk, et une augmentation de la température corporelle de ces souris (Pospisilik et al., 2010). Parallèlement, la diminution de la signalisation Hh dans le TA brun des souris *Boc*<sup>-/-</sup> conduit à une réduction significative de l'expression d'UCP1 et -3 dans les adipocytes bruns (Lee et al., 2015).

La signalisation Hh pourrait ainsi réguler la plasticité du TA *via* l'activation de l'Ampk et la régulation des protéines UCP, favorisant l'apparition d'un TA « beige ».

### 3.3.4. Ciliopathies et obésité

Les ciliopathies sont des pathologies rares, complexes, avec des atteintes multiples (retard mental, cécité, complications rénales, dysplasie osseuse, polydactylie, cardiomyopathie). Elles sont dues à des mutations des gènes codant pour les protéines de structure du cil primaire, notamment des protéines BBS, ayant pour conséquence un défaut de fonctionnement du cil primaire. Parmi ces pathologies, 3 syndromes sont associés à une obésité morbide : Alström, Bardiet-Biedl et MORM (mental retardation, truncal obesity, retinal dystrophy and micropenis) et une insulino-résistance : Alström (pour revue (Fliegauf et al., 2007)).

L'obésité chez ces patients a d'abord suggéré un lien étroit entre le fonctionnement du cil primaire et le comportement alimentaire. Les souris invalidées pour des protéines BBS-2, 4, 6 ou 12, à l'image des mutations observées chez les patients souffrant du syndrome Bardiet-Biedl, sont obèses, résistantes à la leptine et hyperphagiques (Marion et al., 2012; Rahmouni et al., 2008). Une diminution de l'expression hypothalamique de proopiomélanocortine (POMC) suggère un défaut de signalisation de la leptine chez ces

souris (Marion et al., 2012; Rahmouni et al., 2008). D'autres mutations, telles celles des gènes *Kif3a* et *Tg737*, associées à la disparition du cil primaire dans les neurones hypothalamiques des souris adultes, altèrent aussi le comportement alimentaire et entraîne une hyperphagie et une obésité morbide (Davenport et al., 2007). Des données récentes montrent une interaction entre le récepteur de la leptine et BBS1, et suggèrent que l'hyperphagie de ces souris est liée à un défaut du trafic vésiculaire conduisant à une altération de la localisation ciliaire de LepR (Seo et al., 2009).

Cependant, une sensibilité égale à la leptine entre des souris contrôles et des souris présentant des défauts fonctionnelles du cil (souris *Ift88*<sup>-/-</sup> et *Bbs4*<sup>-/-</sup>) suggère qu'un défaut de signalisation de la leptine n'est pas la seule cause de l'obésité associée aux ciliopathies (Berbari et al., 2013).

L'expression des protéines ciliaires BBS10, BBS12, KIF3A et IFT88 est induite lors l'induction de la différenciation adipocytaire et disparaissent ensuite, en accord avec la présence d'un cil uniquement à l'état préadipocytaire (Forcioli-Conti et al., 2015; Marion et al., 2009; Zhu et al., 2009). L'expression d'une autre protéine ciliaire, ALMS1, impliquée dans le syndrome d'Alström, est aussi induite durant la phase précoce d'induction de l'adipogenèse (Romano et al., 2008). *In vitro*, la mise sous silence des gènes *Bbs10* et *Bbs12* dans des préadipocytes humains favorisent la différenciation adipocytaire et affecterait la signalisation Hh (Marion et al., 2009). En particulier, dans les MEF *Bbs7*<sup>-/-</sup>, Ptch est maintenu dans le cil primaire même lors de la stimulation de la signalisation Hh (Zhang et al., 2012). Chez des patients Bardiet-Biedl, l'analyse de biopsies de tissu adipeux sous-cutané montre une augmentation de l'expression génique de nombreux gènes métaboliques adipocytaires comparé au TA de patients obèses ne souffrant pas de ce syndrome (Marion et al., 2012).

Ces données suggèrent que le cil primaire a un rôle clé, transitoire, dans le contrôle de l'adipogenèse au moment de la phase précoce de la différenciation adipocytaire. Ceci pourrait être dû à une inhibition de la signalisation Hh.

## **Résultats expérimentaux**



## Présentation du travail

Les nombreux travaux de la littérature ont révélé le rôle potentiel des vésicules extracellulaires (VE) comme nouveaux médiateurs de la communication intercellulaire. Les stress cellulaires ou adaptatifs tels que l'inflammation associée au TA dans un contexte d'obésité pourraient favoriser la libération de VE par les adipocytes.

Les VE sont des vecteurs d'informations biologiques qui pourraient contribuer à l'apparition de complications métaboliques. Dans un contexte d'obésité, les VE produites par les explants de TA *ex vivo* véhiculent un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires qui favorisent l'inflammation et l'installation d'une résistance à l'insuline au sein du TA (Deng et al., 2009; Kranendonk et al., 2014a, 2014b). Cependant, aucune caractérisation biochimique des différentes classes de VE produites par les cellules adipeuses n'a été réalisée.

Dans ce contexte, la première partie de mon travail de thèse visait à caractériser de manière morphologique et biochimique les populations de VE libérées par les adipocytes. A partir des surnageants d'adipocytes 3T3-L1 déprivés en sérum pendant 24h de manière à favoriser la production de VE et s'affranchir des VE d'origine bovine, nous avons séparé les différentes populations de VE sur la base d'une centrifugation différentielle. A partir des VE isolées, nous avons réalisé une caractérisation protéomique des exosomes et des MP. Cette étude nous a permis de montrer un enrichissement spécifique de certaines classes de protéines dans les exosomes ou les MP respectivement, suggérant un rôle distinct de ces VE. Enfin, ce travail a été complété par l'isolation et la quantification des VE libérées par les adipocytes primaires de souris témoins et obèses. Ces travaux sont présentés dans la première partie des résultats expérimentaux.

Au cours de l'obésité, le TA subit un fort remaniement de ses constitutants cellulaires, lié, notamment, à l'infiltration de cellules immunitaires. Or, ces cellules sont promptes à émettre des VE. Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons voulu évaluer la capacité des VE dérivées de la fraction stroma-vasculaire à réguler le métabolisme adipocytaire. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à un sous-type de VE : les MP lymphocytaires porteuses des protéines Hedgehog (Hh). Notre laboratoire a mis en évidence la production de MP portant spécifiquement ce morphogène (MP<sup>Hh+</sup>) suite à la stimulation d'une lignée humaine lymphocytaire (cellules T-CEM) par des agents prolifératifs et apoptotiques (Martínez et al., 2006). En effet, les VE constituent des vecteurs de diffusion des morphogènes, incluant Hh. De plus, les travaux de notre laboratoire ainsi que d'autres ont révélé la capacité des MP<sup>Hh+</sup> à activer la signalisation Hh dans les cellules cibles. Elles possèdent de plus des propriétés pro-angiogéniques (Agouni



et al., 2007; Benameur et al., 2010) et cardio-protectrices (Paulis et al., 2015). De manière plus générale, de nombreux travaux de la littérature mettent en exergue les propriétés régénératrices des VE dans le contexte des pathologies cardio-vasculaires, notamment dans un contexte post-ischémique. Ceci a conduit à considérer les VE comme de nouveaux outils thérapeutiques potentiels dans le traitement des maladies cardiovasculaires, champ d'investigation que nous avons détaillé sous la forme d'une revue présentée en annexe 2 et publiée dans « *Frontiers in Immunology* » :

**« Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases »**

*Audrey Fleury, Maria Carmen Martinez \* and Soazig Le Lay \**

Front. Immunol., 04 August 2014

La signalisation Hh joue un rôle majeur dans le développement du TA, comme en témoigne des travaux utilisant la protéine recombinante Sonic Hedgehog (non-lipidée) (Shh rec) ou utilisant des agonistes classiques d'activation de la signalisation Hh tels que le SAG (Suh et al., 2006). Cependant, il n'existe aucune donnée concernant la régulation de l'adipogenèse par des VE portant ce morphogène, sous sa forme membranaire.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons ainsi étudié la capacité de ce morphogène à réguler la différenciation adipocytaire lorsqu'associé aux MP (MP<sup>Hh+</sup>). Nos résultats démontrent la capacité des MP<sup>Hh+</sup> à inhiber la différenciation adipocytaire de cellules 3T3-L1 à l'image de Shh rec ou du SAG. Cependant, nous révélons que ces effets inhibiteurs sont liés à l'activation d'une voie non-canonique, selon un axe Smo/Ampk/Lkb1. Ces résultats sont présentés sous forme de manuscrit actuellement soumis pour publication à « *EMBO reports* » :

**« Hedgehog associated to microparticles inhibits adipocyte differentiation via a non-canonical pathway »**

*Audrey Fleury<sup>1</sup>, Lucile Hoch<sup>2</sup>, M. Carmen Martinez<sup>1</sup>, Hélène Faure<sup>2</sup>, Maurizio Taddei<sup>3</sup>, Elena Petricci<sup>3</sup>, Fabrizio Manetti<sup>3</sup>, Nicolas Girard<sup>4</sup>, André Mann<sup>4</sup>, Caroline Jacques<sup>1</sup>, Jérôme Larghero<sup>5</sup>, Martial Ruat<sup>2</sup>, Ramaroson Andriantsitohaina<sup>1</sup> and Soazig Le Lay<sup>1\*</sup>*

## Résultats expérimentaux I

### **Caractérisation des populations de vésicules extracellulaires libérées par les adipocytes**

#### But du travail

L'obésité est un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires et de thromboses veineuses, maladies pour lesquelles les VE ont été identifiées comme des marqueurs prédictifs potentiels. De surcroît, les profils et les concentrations de MP circulantes sont bien souvent altérés chez les patients obèses (Esposito et al., 2006b; Goichot et al., 2006; Tramontano et al., 2010). Ainsi, l'augmentation des taux de MP procoagulantes et pro-inflammatoires observées chez ces patients pourraient contribuer au développement de complications métaboliques associées à l'obésité. En revanche, il n'existe que peu de données concernant les exosomes circulants dans le contexte des pathologies métaboliques.

Aucune des études de caractérisation des VE dans un contexte physiopathologique d'obésité ne s'est attachée à distinguer les MP des exosomes. De plus, la majorité des données concernant les VE dérivées du TA proviennent de VE produites à partir d'explants de TA. Ainsi, ces études ne s'affranchissent pas du fort remodelage tissulaire associé à l'hypertrophie du TA, et de ce fait incluent une proportion non négligeable de VE qui dériveraient des cellules de la fraction stroma-vasculaire. En l'absence d'une caractérisation de VE exclusivement adipocytaire, on ne connaît à ce jour aucune protéine spécifiquement exprimée par les cellules adipeuses qui pourrait être utilisée comme marqueur adipocytaire permettant de quantifier les VE circulantes dérivées des adipocytes.

Un préalable à l'étude de l'effet des VE adipocytaires sur des fonctions métaboliques clés a consisté à caractériser les populations de VE spécifiquement dérivées des adipocytes, et ce dans un contexte sain ou d'obésité.

L'objectif du travail présenté était, en premier lieu, de caractériser d'un point de vue biochimique et protéique les différentes populations de VE isolées à partir de cellules

adipocytaires différenciées *in vitro* (3T3-L1).

Pour ce faire, nous avons isolés à partir de surnageants de culture de 3T3-L1 soit la totalité des VE dérivées des adipocytes, soit nous avons séparé les MP des exosomes. Par une analyse en microscopie électronique, nous avons caractérisé les MP et les exosomes morphologiquement et les avons quantifié sur la base de leur contenu protéique. Nous avons ensuite, par une analyse protéomique, pu distinguer des compositions significativement différentes entre les deux sous-populations de VE. Sur la base de ces résultats, nous avons caractérisé plus avant les VE à partir d'adipocytes isolés soit de TA de souris obèses (*ob/ob*) ou contrôles (*ob/+*). Nos premiers résultats nous permettent de présenter une analyse quantitative des VE dérivés des adipocytes *ex vivo* qui va être croisée par une analyse qualitative.

## Matériels et Méthodes

*Produits chimiques* - L'ensemble des produits chimiques utilisé ainsi que l'insuline, la 3-isobutyl-méthyl-1-xanthine (IBMX), la dexaméthasone proviennent de chez Sigma-Aldrich.

*Expérimentation animale sur souris* - L'expérimentation animale menée sur les souris a été réalisée selon la réglementation et la législation française en vigueur. Le protocole expérimental utilisé a été validé par le comité régional d'éthique et d'expérimentation animale des Pays de la Loire, ainsi que le ministère de la recherche, sous le numéro d'agrément D49007002.

Les souris obèses (*ob/ob*), du fait d'une mutation acquise sur le gène de la leptine, ainsi que les souris contrôles (*ob/+*) correspondantes ont été initialement obtenues des laboratoires Charles River (L'arbresle, France) et hébergées au Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire (SCAHU). Les souris sont maintenues dans une animalerie climatisée, avec un cycle jour/nuit de 12h, et accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum* avec un régime standard composé pour 65% de calories sous la forme de glucides, 24% sous la forme de protéines et 11% sous la forme de lipides. L'accouplement de souris hétérozygotes (*ob/+*) a permis l'obtention de souris contrôles (*ob/+*) ou obèses (*ob/ob*). Le génotypage des animaux est effectué à partir d'ADN isolé de morceaux de queues des animaux par PCR (T° amplification 64°C, 34 cycles) suivi d'un dépôt des amplicons sur gel d'agarose 4% en utilisant les amorces suivantes : amorce sens 5' TGTCCAAGATGGACCAGACTC 3' ; amorce antisens ; 5' ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCA 3'. Les souris obèses (*ob/ob*) et leurs témoins (*ob/+*) utilisées étaient âgées de 4 à 6 mois. Les prélèvements sanguins ont été effectués sur des souris de 6 mois, anesthésiées par de l'isoflurane (débit d'air 200mL/min, isoflurane 2,5%) par ponction intracardiaque.

*Explants de tissus adipeux et isolation des adipocytes* - 3 à 5g de tissus adipeux (TA) péri-gonadiques ont été émincés (morceaux d'environ 1 mm<sup>3</sup>) dans du tampon Krebs (supplémenté avec 0.1% d'albumine bovine sans acides gras, pH 7.4), puis lavés trois fois par centrifugations successives à 100g pendant 1 min dans du milieu ECBM (Endothelial Cell Basal Medium) avant d'être repris dans du milieu ECBM/Hepes/0.1%BSA. Les adipocytes sont isolés suite à une digestion par de la collagénase A (1mg/mL dans du tampon Krebs, Roche Diagnostics, Saint Egrève), suivi d'une filtration sur tamis d'un maillage de 150µm, puis lavés trois fois avec du milieu ECBM/Hepes/0.1%BSA. Les explants de TA et les adipocytes isolés ont ensuite été cultivés selon un protocole développé par Jean GALITZKY (INSERM UMR1048) qui consiste à leur mise en culture dans des CLINiCell® 25cm<sup>3</sup> (Mabio, Tourcoing, France)

pendant 48h dans 10 mL de milieu ECBM/Hepes/0.1%BSA.

*Culture cellulaire* - La culture cellulaire a été effectuée sous PSM type II (Poste de sécurité microbiologique) avec du matériel stérile et des milieux préchauffés à 37°C. Les cellules sont mises en culture dans un incubateur à 37°C, 10% CO<sub>2</sub>.

Les préadipocytes 3T3-L1 sont cultivés dans du « *Dulbecco's modified Eagle's medium* » (DMEM) à 4,5 g/L de glucose, supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). La différenciation adipocytaire des 3T3-L1 est induite par ajout d'IBMX (250µM), de dexaméthasone (1,25 µM) et d'insuline (250 nM) pendant 3 jours. Les cellules sont ensuite cultivées en DMEM 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de SVF en présence de 100nM d'insuline jusqu'à différenciation complète en adipocytes matures (J8 à J10). La production de VE correspond à l'isolement de VE partir de surnageants de 3T3-L1 matures (J8-J10) cultivés 24h dans du DMEM sans SVF.

*Isolation des vésicules extracellulaires (VE)* - Les surnageants de culture des adipocytes isolés, d'adipocytes 3T3-L1 matures ou d'explants de TA sont collectés afin d'isoler les VE totales, les microparticules (MP) puis les exosomes. Les surnageants sont tout d'abord centrifugés à 1,500g pendant 20 min, puis 1,500g pendant 5 min afin d'éliminer respectivement les cellules et les débris cellulaires. Les VE totales sont directement culottées par ultracentrifugation (rotor MLA-50, Beckman Optima MAX XP Ultracentrifuge) à 100,000g pendant 1h, 4°C, puis lavées une fois dans du NaCl (100,000g, 1h à 4°C) et reprises dans du NaCl 0.9%. Les culots de MP sont isolés à partir des surnageants cellulaires préalablement déplétés des débris cellulaires par centrifugation 13,000g pendant 1h, suivi de deux lavages par centrifugation à 13 000g pendant 30min dans du NaCl 0.9% avant d'être repris dans du NaCl 0.9%. Le culot d'exosomes est enfin isolé à partir des surnageants déplétés en MP par une ultracentrifugation (rotor MLA-50, Beckman Optima MAX XP Ultracentrifuge) à 100,000g pendant 1h à 4°C, puis lavé une fois dans du NaCl 0.9% (100,000g, 1h à 4°C) et repris dans du NaCl 0.9%. Le contenu protéique des VE a été mesuré grâce au kit DC-protein assay (BioRad, Marnes la Coquette, France) en utilisant l'albumine bovine comme standard.

*Immunodétection par Western-Blot* - Les adipocytes isolés ou 3T3-L1 sont lysés dans un volume approprié de tampon de lyse (50 mM Tris pH 7,4, 0,27 M saccharose, 1 mM Na-orthovanadate pH10, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50 mM NaF, 5 mM pyrophosphate, 1% (masse/vol) Triton X-100, 0,1 % (masse/vol) 2- $\beta$  mercaptoéthanol, et inhibiteurs de protéases). Les lysats totaux sont centrifugés (15 000g, 4°C pendant 10 mn) puis stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les concentrations en protéines sont déterminées selon la méthode de Bradford avec l'albumine bovine pour standard. Les lysats cellulaires (8  $\mu$ g) ou les préparations de VE (8  $\mu$ g) sont dilués dans du tampon Laemmli 6X, dénaturés 5 min à 95°C, puis migrés en SDS/PAGE sur des gels gradients (4-12%) de polyacrylamide (Novex® NuPAGE® precasted gels, Life Technologies, Saint Aubin, France) et transférés sur des membranes de nitrocellulose (GE Healthcare, Pittsburg, PA). Les membranes sont ensuite saturées pendant 2 h à température ambiante dans du tampon TBS-T (50mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl 0.1% (vol/vol) Tween-20) additionné de 5% (masse/vol) d'albumine bovine et incubées avec les différents anticorps. Après trois lavages dans le tampon TBS-T, elles sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Les signaux sont révélés en chemiluminescence (Pierce-Perbio Biotechnologies) par utilisation du système d'imagerie Chemi-smart 5000 imager system (Vilber-Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau ci-après :

**Table 2 : Liste des anticorps utilisés en western-blot**

<b>ANTICORPS</b>	<b>SOURCE</b>	<b>Référence</b>	<b>conditions</b>	<b>Anticorps 2nd</b>
$\beta$ -Actine	Sigma	5316	dénaturant	souris
Adiponectine	Thermo scientific	PA1-054	dénaturant	lapin
Alix	BD transduction laboratories	611620	dénaturant	souris
aP2/FABP4	Cell signaling technology	2120	dénaturant	lapin
Cavéoline-1	Santa cruz biotechnology	(N-20): SC-894	dénaturant	lapin
CD9	BD Pharmigen	553758	non dénaturant	souris
CD63	Marine biological laboratory	D263-3	non dénaturant	rat
CD81	Santa cruz biotechnology	(EAT2): SC-18877	non dénaturant	hamster Arménien
Flottiline-1	BD transduction laboratories	610821	dénaturant	souris
Flottiline-2	BD transduction laboratories	610383	dénaturant	souris
Mfge-8	Marine biological laboratory	D199-3	dénaturant	hamster Arménien
Péripiline-1	Progen Biotechnic	GP29	dénaturant	cochon d'inde

*Microscopie électronique* - Les préparations de VE sont fixées avec 2.5% de glutaraldéhyde 0,1M dans du tampon Sorensen 0.1 M (pH 7.4) pendant 16h à 4°C, puis rincées trois fois à température ambiante. Les échantillons sont post-fixés dans un

tampon 2% tetroxide d'Osmium tetroxyde/1.5% ferrocyanide de potassium. Enfin, les échantillons sont déshydratés dans des concentrations croissantes d'éthanol, infiltrés de résine (Epon Araldite, Polybed 812 embedded kit, Polysciences/Biovalley) et polymérisés à 60°C. Les inclusions sont coupées en sections de 70 nm à l'aide d'un microtome EM-UC7 ultramicrotome (Leica, Nanterre, France). Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope électronique à transmission Jeol JEM 1400 (Jeol, Croissy sur Seine, France) et réalisées à 120 KeV.

#### *Analyse protéomique des VE*

L'analyse protéomique a été réalisée par la plateforme PAPPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest, INRA Jouy en Josas).

1) *Digestion enzymatique des peptides* – 8 µg de préparations de VE (VE totales, MP et exosomes) ont été migrés sur gel SDS-PAGE. Après révélation au bleu de coomassie pendant la nuit, les différentes bandes visibles (correspondant aux protéines associées aux VE) sont excisées du gel SDS-Page et transférées dans un eppendorf dans une solution à 1% d'acide acétique. Les morceaux de gel d'acrylamide sont ensuite lavés deux fois dans de l'eau et dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 25 mM-50% acétonitrile, avant d'être déshydratés avec une solution d'acétonitrile 100%. Les fragments de gel déshydratés sont ensuite placés à 56°C pendant 1 h dans un tampon dénaturant 10 mM DTT contenant du bicarbonate d'ammonium 12.5 mM. Les surnageants sont alors éliminés et l'alkylation des résidus cystéines est réalisée à l'obscurité pendant 45 min dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 25 mM supplémenté d'iodoacétamide 55mM. L'excès d'iodoacétamide est neutralisé par des lavages dans une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM-50% acétonitrile. Le gel est ensuite déshydraté par une solution d'acétonitrile 100%. Les protéines sont ensuite digérées dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 25 mM et 5 mM CaCl<sub>2</sub> contenant la trypsine pendant 12 h à 37°C. Le lendemain, la digestion enzymatique est neutralisée par une solution de TFA (trifluoroacetic acid) 1%-50% acétonitrile, puis les peptides sont extraits dans un bain d'Acétonitrile 100%.

2) *Identification des peptides par spectrométrie de masse ou MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass spectrometry)*

Les peptides préalablement séparés selon leur taille par un système de chromatographie liquide (HPLC) sont ensuite injectés et analysés grâce au spectromètre de masse hybride quadripôle-Orbitrap QExactive™ HF (Thermo Fisher). L'identification des protéines a été réalisée grâce au logiciel X!Tandem qui compare les spectres MS/MS obtenus avec des spectres MS/MS générés *in silico* à partir de banques de séquences protéiques.

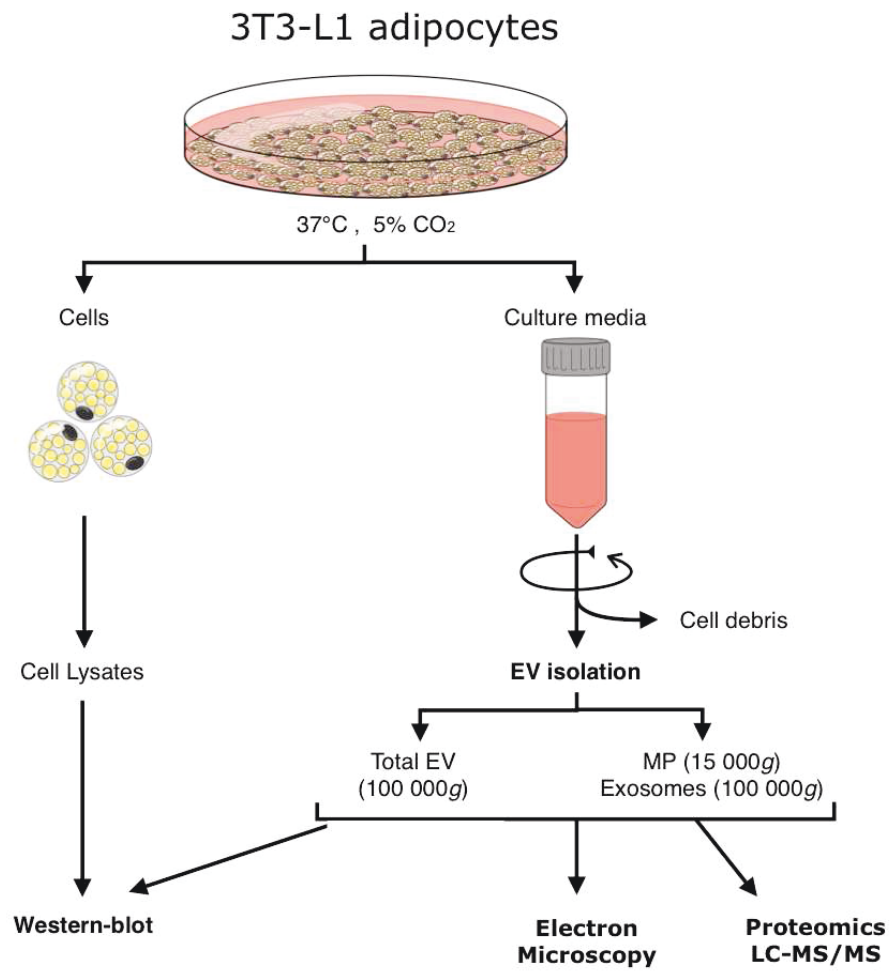
### 3) *Analyse quantitative des données protéomiques*

Deux méthodes complémentaires pour analyser de manière statistique l'enrichissement de protéines dans l'un ou l'autre type de VE peuvent être utilisées. Le spectral counting mesure et compare le nombre de spectres MS/MS identifiant les spectres d'une protéine (Gautier, 2012). Cette méthode est basée sur l'hypothèse selon laquelle le nombre de spectre correspondant aux peptides d'une protéine est directement lié à l'abondance de la protéine dans l'échantillon. Dans cette analyse sont pris en compte les peptides pour lesquels une différence de 5 spectres entre les deux types de VE, MP et exosomes, a été détectée.

L'analyse Xic (eXtracted Ion Chromatogram) est basée sur la mesure et la comparaison des intensités des signaux MS des peptides d'une protéine (Gautier, 2012). La quantification est réalisée en comparant les XIC des peptides entre les deux types de VE.

*Analyse statistique* - Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M. Les valeurs sont examinées par une analyse de variance (ANOVA) ou par un test t de Student. Les valeurs sont considérées comme statistiquement différentes pour \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .





**Figure 27 : Isolation des VE adipocytaires 3T3-L1.** Représentation schématique de la procédure utilisée pour l'isolation des différents sous-types de VE et leur caractérisation structurale et protéomique.

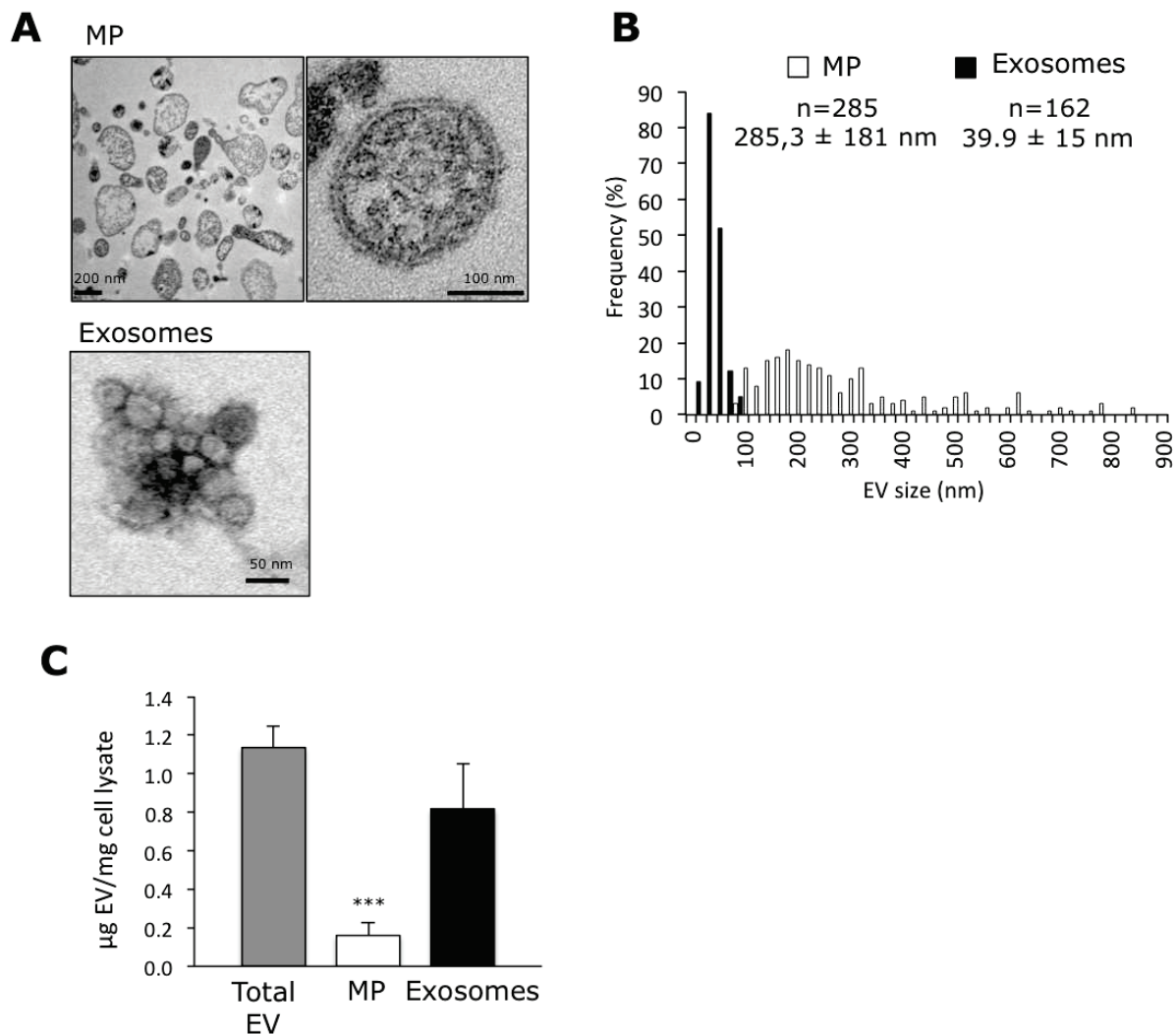
## Résultats

### ***Isolation et quantification des vésicules extracellulaires (VE) dérivées d'adipocytes matures 3T3-L1***

Afin d'isoler et caractériser les vésicules extracellulaires dérivées d'adipocytes, nous avons choisi de travailler avec le modèle cellulaire *in vitro* d'adipocytes matures 3T3-L1. Nous avons ainsi isolé les différents types de VE par une série de centrifugations différentielles à partir de surnageants d'adipocytes cultivés 24h dans un milieu sans sérum (afin de s'affranchir d'une potentielle contamination par des VE sériques) (voir protocole schématisé Figure 27). Nous avons ainsi réalisé soit des préparations de VE totales (par une ultracentrifugation à 100,000g après élimination des cellules/débris cellulaires), soit isolé séquentiellement les MP (correspondant au culot d'une centrifugation à 13,000g) puis les exosomes (culot d'une ultracentrifugation à 100,000g).

Afin de caractériser la morphologie et la taille des VE, nous avons réalisé une analyse par microscopie électronique des deux populations de VE isolées : les MP et les exosomes. Comme attendu, les images des préparations de MP révèlent la présence de microvésicules hétérogènes en taille et de forme variable (comprise entre 200 et 800nm) présentant une double membrane délimitant un contenu dense aux électrons (Figure 28A). En revanche, les exosomes présentent une population de microvésicules plus homogène en taille comprise entre 30 et 100 nm (Figure 28A). La mesure de la taille de ces microvésicules (réalisée sur la base de leur mesure sur les images de microscopie électronique) confirment deux populations de VE distinctes : les exosomes regroupent des VE de petite taille ( $39.9 \pm 15$  nm) tandis que les MP regroupent en moyenne des VE sept fois plus grosses ( $285,3 \pm 181$  nm) (Figure 28B). Ces caractéristiques morphologiques sont en accord avec les tailles décrites respectivement pour les exosomes et les MP dans la littérature (EL Andaloussi et al., 2013).

Nous avons par la suite quantifié la sécrétion de ces deux types de VE par les adipocytes 3T3-L1 sur la base de leur contenu protéique. Nous détectons une production basale de VE totales dérivées des adipocytes 3T3-L1 d'environ 1  $\mu$ g VE/mg lysat cellulaire (Figure 28C). L'isolation sélective des MP d'une part, et des exosomes d'autre part, permet d'établir que la majorité des VE sécrétées par les adipocytes 3T3-L1 sont des exosomes, qui sont retrouvées cinq fois plus abondamment que les MP (en quantité protéique) (Figure 28C).



**Figure 28 : Caractérisation morphologique et quantification des vésicules extracellulaires (VE) sécrétées par les adipocytes 3T3-L1.**

A- Images de microscopie électronique obtenues par analyse des préparations de MP et d'exosomes.

B- Graphique illustrant la distribution de taille de la population de MP et d'exosomes, sur la base des diamètres des VE mesurés sur les images de microscopie électronique.

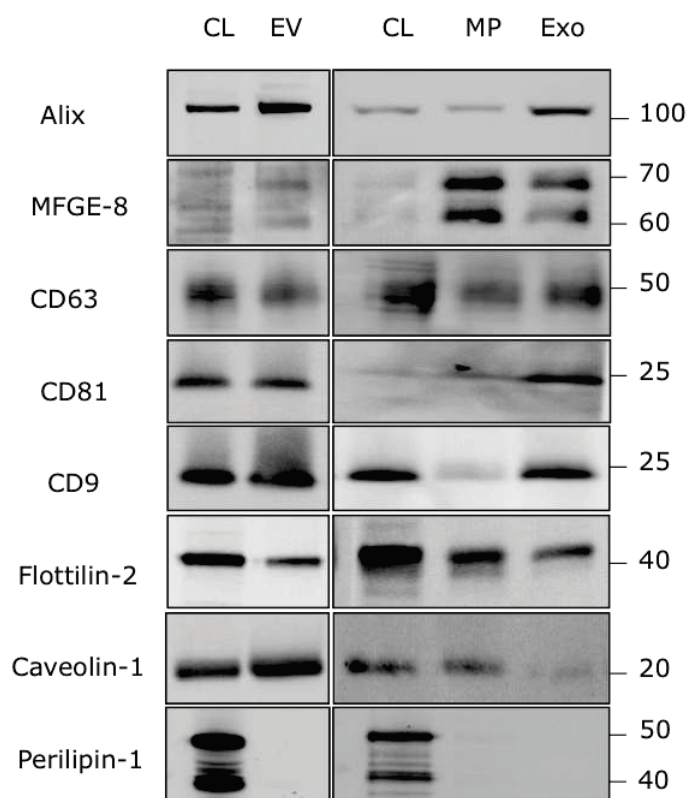
C- Quantification des VE sécrétées par les adipocytes 3T3-L1 suite à leur isolation à partir de milieux conditionnés (24h). Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± sem d'au moins n=7 expériences indépendantes, et sont exprimés en μg prot VE/mg lysat adipocytaire.

\*\*\* p<0.001

Afin de valider la pureté de nos préparations de VE, nous avons recherché la présence de marqueurs protéiques identifiés comme enrichis dans les VE. Plus particulièrement, nous avons cherché à caractériser par western-blot la présence de protéines transmembranaires telles que les tétraspanines (CD9, CD63 ou CD81), de protéines impliquées dans le trafic endo-lysosomal et associé au complexe ESCRT (Alix), de protéines extracellulaires liant les lipides comme Mfge-8/lactadhérine, de protéines caractéristiques de microdomaines lipidiques membranaires (flottiline-2 et cavéoline-1) ou encore du cytosquelette ( $\beta$ -actine) (Figure 29). L'ensemble de ces protéines est détecté dans les lysats cellulaires de 3T3-L1 matures (CL), dans les VE totales (EV) ainsi que dans les MP et/ou les exosomes (Figure 29). De manière intéressante, les protéines Alix, CD81 et CD9 se retrouvent spécifiquement enrichies dans les exosomes, en accord avec une origine endo-lysosomale de ces VE. En revanche, les protéines membranaires enrichies dans les radeaux lipidiques, telles que cavéoline-1 et flottiline-2, sont détectées majoritairement dans les MP en accord avec l'origine membranaire de cette population de VE. D'autre part, Mfge-8 fortement enrichie dans les exosomes (pour revue (Chaput and Théry, 2011)), est également associée à la fraction de MP. En outre, la périlipine-1, protéine marqueur des gouttelettes lipidiques, est très exprimée dans les lysats adipocytaires mais absente des préparations de VE.. Cette caractérisation biochimique, basée sur la détection des marqueurs de VE et l'absence de protéines spécifiques de compartiments cellulaires tel que la gouttelette lipidique, valide la pureté et la qualité des VE isolées des adipocytes matures.

### ***Analyse protéomique par LC-MS/MS des différents sous types de VE isolées d'adipocytes 3T3-L1***

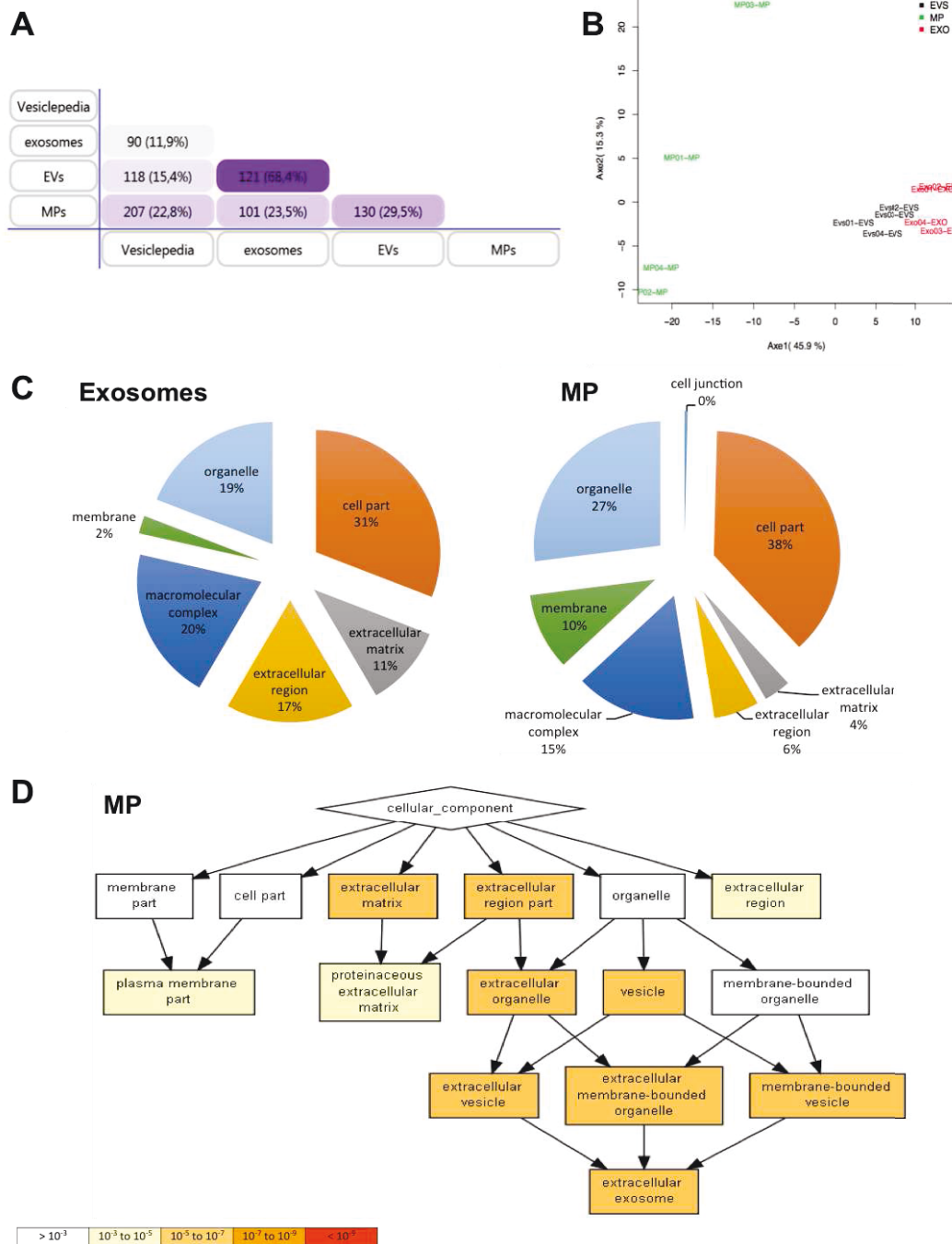
Par la suite nous avons cherché à caractériser la composition protéique des deux populations de VE. Pour cela, quatre préparations indépendantes des deux populations de VE (exosomes et MP) ou les VE totales ont été migrées sur gel SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie. Afin de réaliser une analyse fine des protéines par type de VE, les différents lignes du gel (correspondant à une préparation de VE) ont ensuite été découpées en petits morceaux, soumis à une digestion par de la trypsine, et les peptides extraits ont été analysés par « nano-spray LC-MS/MS ».



**Figure 29 : Caractérisation biochimique des VE sécrétées par les adipocytes 3T3-L1 sur la base de la détection de marqueurs protéiques.** Immunoblot des différents marqueurs protéiques décrits pour être associés aux VE. La périlipine-1 est utilisée comme marqueur des gouttelettes lipidiques. CL : Cell lysate ; EV : extracellular vesicle; MP : Microparticle; Exo : Exosomes. La taille du marqueur de poids moléculaire est indiquée en kDa sur la droite. Les différents anticorps utilisés pour détecter les différentes protéines sont référencés dans la table 2.

Au total, 441 protéines ont été identifiées (sur la base de la détection d'au moins 2 spectres peptidiques correspondant à la protéine par échantillon) (liste présentée en annexe 1). Les MP constituent la population de VE présentant la plus grande diversité protéique (402 protéines identifiées) comparées aux exosomes (129 protéines). De manière inattendue, seulement 29.5% des protéines identifiées dans les MP le sont aussi dans les préparations de VE totales (réalisées par une centrifugation à 100,000g, sans centrifugation préalable à 15,000g) (Figure 30A). Lorsque ces différentes populations de VE sont comparées à la base de données Vesiclepedia (Kalra et al., 2012), on ne retrouve que 15.4%, 22.8% et 11.9% des protéines respectivement dans les VE totales, les MP et les exosomes qui ont été préalablement identifiées comme associées aux VE. En revanche, le profil protéique des VE totales est très similaire à celui des exosomes avec 68.4% de protéines communes entre les deux populations (Figure 30A). Cette forte similarité entre les exosomes et les VE totales est confirmée par une analyse en composante principale permettant de projeter toutes les variations entre les différentes populations de VE, et qui établit une ségrégation similaire des préparations de VE totales et d'exosomes comparées aux MP (Figure 30B). Ainsi, plus de la moitié des variations observées (somme des axes : 61.2%) entre les MP et les exosomes ou VE totales, s'explique par une variation de leur contenu protéique.

Parmi les protéines identifiées en LC/MS-MS (annexe 1), on retrouve Alix, CD81, des protéines sécrétées comme Mfge-8, ou encore des protéines membranaires (cavéoline-1) en accord avec notre validation des préparations par Western-Blot (Figure 31). Cependant, certaines protéines détectées par Western-Blot ne sont pas retrouvées dans l'analyse protéomique (CD9 ou C63) et témoigne de la meilleure sensibilité de cette technique basée sur la détection par anticorps par rapport à la spectrométrie de masse. La présence de protéines dérivées du compartiment endo-lysosomal (LAMP-2B) ou encore de chaperones comme les protéines de la famille des Hsp70 ou Hsp90 confirment la qualité de nos préparations de VE. En outre, l'analyse protéomique révèle aussi la présence de nombreuses familles de protéines : des protéines liées au cytosquelette (actines, myosines, moesin, cofiline-1), des protéines du trafic membranaire (rabs, annexines), des modulateurs enzymatiques (Ras/Rho GTPases), des protéines régulatrices de l'expression génique en particulier dans la traduction (histones, protéines ribosomales), des protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycanes), des transporteurs (canaux ioniques, transporteurs de lipides) ou encore des protéines transmembranaires (intégrines, cavéoline-1, flottiline-2).



**Figure 30 : Caractérisation et classification des protéines identifiées à partir des différents sous-types de VE isolées d'adipocytes 3T3-L1.**

A- Comparaison des protéines identifiées dans chaque population de VE, MP ou exosomes, ou encore les VE totales (MP et exosomes) avec la base de données Vesiclepedia.

B- Analyse par composante principale des protéines identifiées dans les VE sécrétées par les adipocytes 3T3-L1 (VE, MP et exosomes).

C- Analyse de l'ontologie génique (Gene Ontology, GO) des protéines identifiées dans les MP et les exosomes sur la base d'une analyse par composant cellulaire (Cellular Component) par le logiciel Panther. Le pourcentage de protéines par sous-catégorie est indiqué.

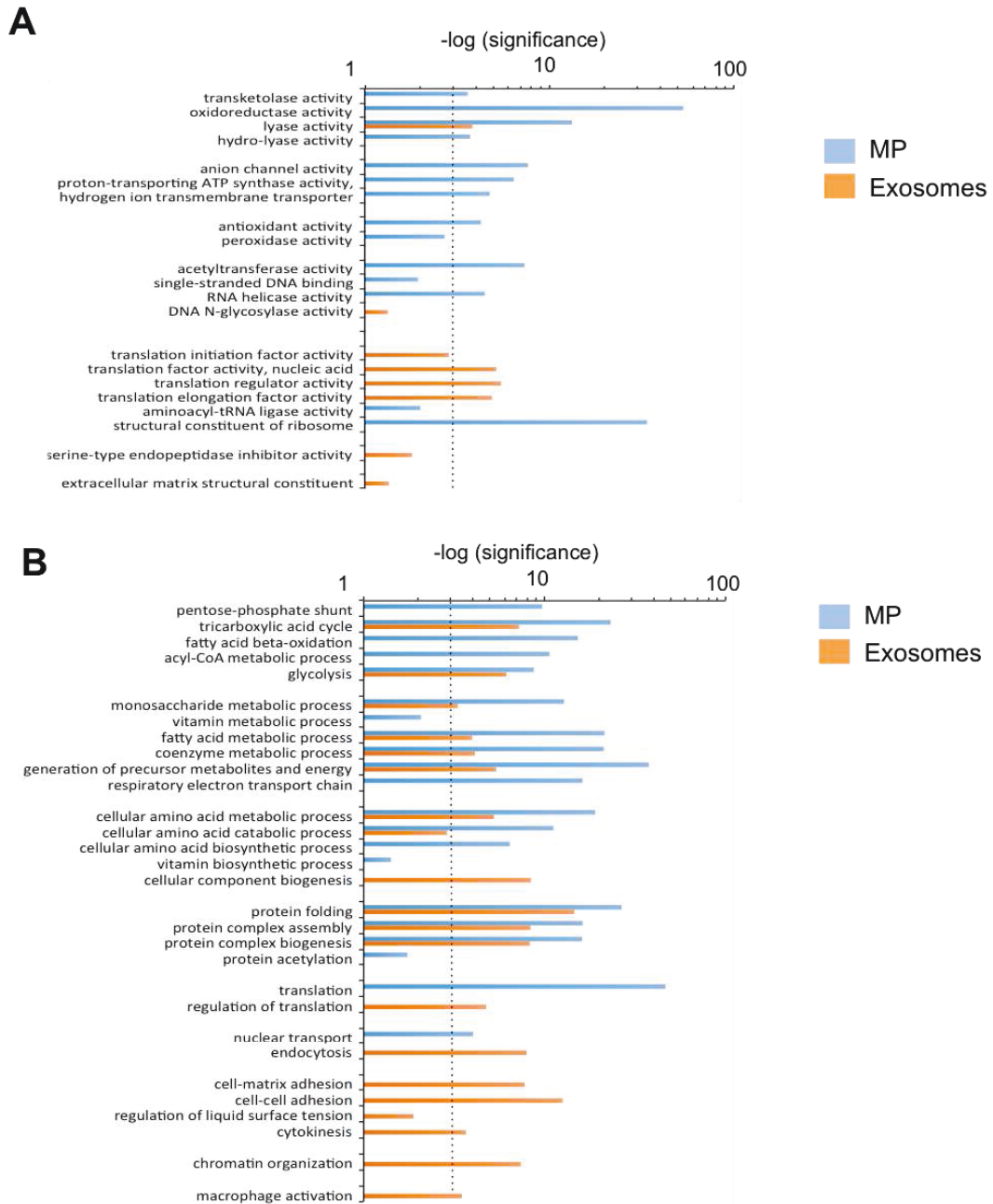
D- Analyse de l'ontologie génique par composant cellulaire par le logiciel Gorilla pour les MP. Le code couleur de l'échelle de significativité (valeur de  $p$ ) est indiqué en bas de la figure.

De manière intéressante, les VE véhiculent aussi des molécules de signalisation (adiponectine, visfatine, LPL) mais aussi des protéines participant à l'immunité comme les complexes majeurs d'histocompatibilité. Enfin, la famille de protéines la plus largement représentée regroupe des protéines présentant une activité enzymatique, qui interviennent dans de nombreux processus du métabolisme (glycolyse, métabolisme lipidique, carbohydrates).

Nous avons ensuite cherché à comparer la composition protéique des MP par rapport aux exosomes. Sur la base d'une analyse par ontologie génique (GO), en utilisant les catégories de GO définies par le consortium GO (The Gene Ontology Consortium, 2001), nous avons tout d'abord procédé à une classification des protéines selon la terminologie de GO « composant cellulaire » (Cellular component), sur la base d'une classification obtenue avec le logiciel Panther (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships). Bien que les catégories de GO restent identiques entre les MP et les exosomes, cette analyse révèle un enrichissement des MP en GO correspondant aux composants membranaires, éléments cellulaires (« cell part ») et organelles comparés aux exosomes qui sont quant à eux enrichis en GO correspondant à la matrice extracellulaire, région extracellulaire et complexe macromoléculaire (Figure 30C). Cette analyse peut être complétée par l'analyse des catégories GO de composant cellulaire réalisée cette fois avec le logiciel Gorilla (Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool) qui permet de visualiser un enrichissement significatif des MP en éléments de la membrane plasmique (« plasma membrane part ») et en vésicules extracellulaires, catégorisé sous le GO « extracellular exosome » (Figure 30D).

L'analyse des exosomes et MP selon les catégories de GO « fonction moléculaire ou processus biologique » révèle aussi différentes activités cellulaires qui diffèrent entre MP et exosomes. Ainsi, les activités oxydoréductases, de transport d'ions, de liaison d'acides nucléiques ou de traduction (notamment du fait de la présence de constituants ribosomaux) sont surreprésentées dans les MP (Figure 31A). Cette surreprésentation d'activités enzymatiques est à mettre en lien avec les nombreux processus métaboliques primaires et les processus de synthèse/repliement de protéines, largement enrichis dans les MP dans une analyse des GO selon les processus biologiques (Figure 31B). En revanche, les exosomes présentent un enrichissement des fonctions de traduction lié à une surreprésentation de facteurs d'initiation et d'élongation (Figure 31A). En terme de processus biologiques, les protéines des exosomes sont particulièrement impliquées dans l'adhésion cellulaire, l'organisation chromatinienne, l'activation macrophagique mais présente aussi des implications dans de nombreux processus métaboliques primaires (Figure 31B).





**Figure 31 : Analyse par ontologie génique selon la fonction moléculaire ou le processus biologique.** 128 protéines exosomales et 405 protéines des MP ont été classées selon les catégories « fonction moléculaire » (A) ou « processus biologique » (B), sur la base de GO prédéfinis (GO consortium). Les graphiques représentent l'enrichissement des protéines identifiées dans les MP ou les exosomes selon le classement « GO Slim enrichment » du logiciel Panther. Le seuil d'enrichissement retenu a été fixé à au moins 5. Les données sont présentées selon le  $(-\log p)$ , ou  $p$  représente la significativité. La ligne discontinue représente le seuil de significativité de  $p=0.001$  ou  $p<10^{-3}$ .

Sur la base de deux analyses statistiques, prenant en compte soit la comparaison du nombre de spectres détectés par échantillon (spectral counting) ou l'intégration du courant d'ion peptidique (XIC), nous avons déterminé les variations protéiques significativement différentes entre les MP et les exosomes (voir liste respective des protéines dans les tables 3 et 4). En combinant ces deux analyses statistiques complémentaires, nous avons établi que 63 protéines étaient significativement associées aux MP (dont 33 exclusivement détectées dans les MP et absentes des exosomes) (Table 3). A l'inverse, 27 protéines sont significativement enrichies dans les exosomes (dont 3 exclusivement détectées dans les exosomes et absentes des MP) (Table 4).

Ainsi, les MP transportent de nombreuses enzymes impliquées dans la régulation du métabolisme primaire, des modulateurs enzymatiques, des transporteurs d'ions et de lipides, des protéines du trafic membranaire et des protéines régulant l'activité transcriptionnelle par liaison aux acides nucléiques. De manière intéressante, les MP se distinguent par leur enrichissement en chaperonnes (notamment de la famille des Hsp70 et 90) et de protéines disulfides isomérases qui sont liées aux processus d'autophagie dépendant des chaperonnes (Table 3).

Les exosomes présentent quant à eux un très fort enrichissement en protéines de matrice extracellulaire, en protéines nucléaires (histones et protéine de voûte - Major Vault Protein) ou encore en certaines enzymes métaboliques (FAS, ACC1) ou molécules de signalisation (adiponectine, LPL) régulant des processus métaboliques clés (Table 4).

Une représentation schématique de ces familles de protéines enrichies soit dans les MP ou soit les exosomes est présentée Figure 32A.

**Table 3 : Protéines spécifiquement enrichies dans les MP.** L'enrichissement de protéines dans les préparations de VE a été calculé sur la base de deux analyses (spectral counting ou XIC). La valeur p (représentative de la significativité) est présentée pour les deux types d'analyses. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 10^{-3}$ , avec la nécessité d'avoir une différence au moins de 5 spectres entre deux échantillons de VE pour valider l'enrichissement. Les protéines spécifiquement présentes dans les MP (et non détectées dans les exosomes) sont surlignées en gras.

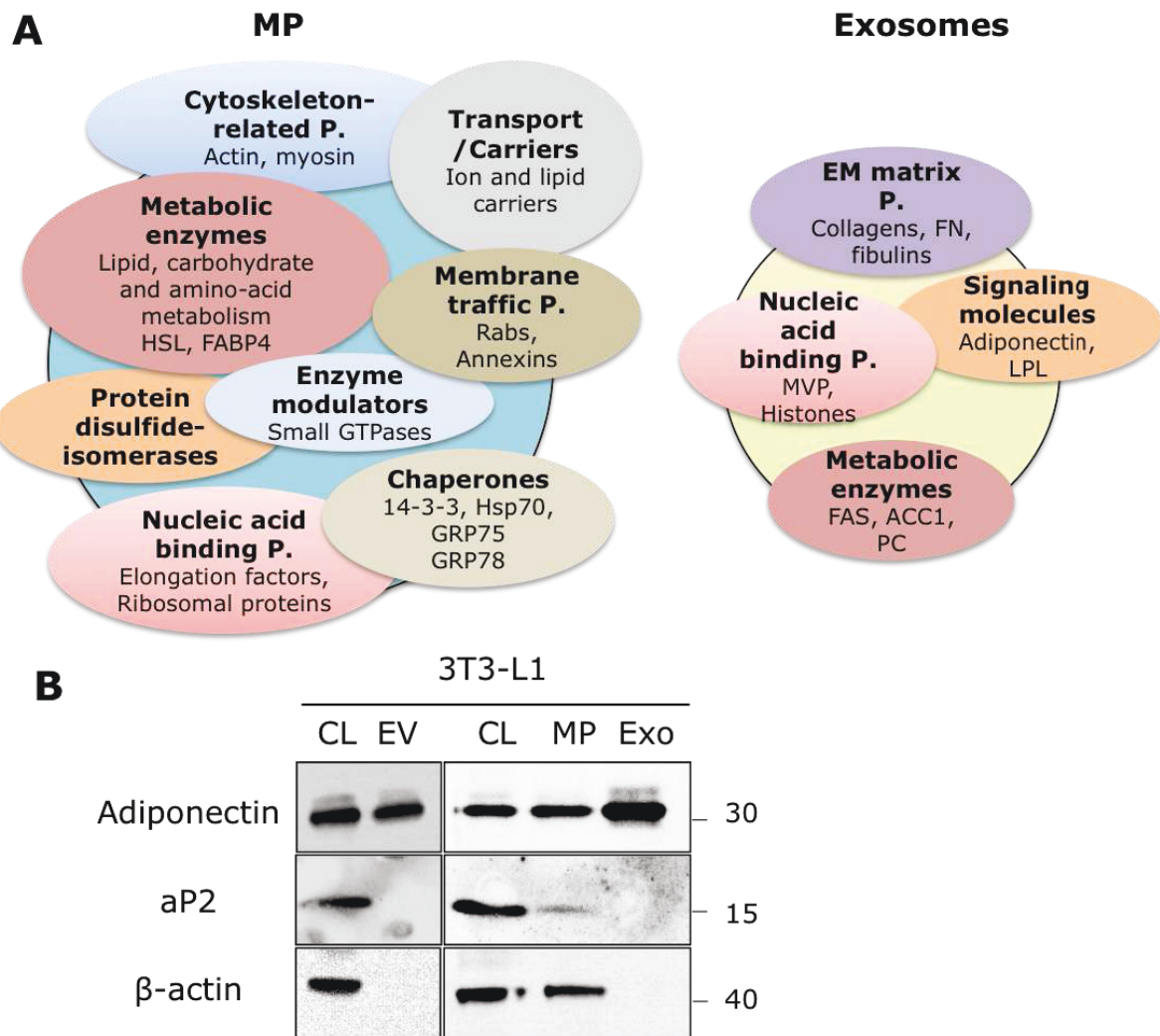
Protein class	Acc N°	Entry name	Protein description	<i>p value</i>	
				Spectral counting	XIC
<b>Chaperones</b>	P63101	1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	NA	0,000003
	Q9CQV8	1433B	14-3-3 protein beta/alpha	NA	0,050240
	<b>P63038</b>	<b>CH60</b>	<b>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,040581</b>
	P20029	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	0,017960	0,000235
	P08113	ENPL	Endoplasmic	0,019419	0,020042
	P63017	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	0,020165	0,744457
	P11499	HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta	0,020165	0,036371
	P38647	GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	<b>0,013874</b>	<b>0,027734</b>
<b>Cytoskeleton related protein</b>	<b>P26041</b>	<b>MOES</b>	<b>Moesin</b>	<b>NA</b>	<b>0,002455</b>
	P13020	GELS	Gelsolin	0,017960	0,003900
	P60710	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	0,020165	NA
	P63260	ACTG	Actin, cytoplasmic 2	0,020165	NA
	P68372	TBB4B	Tubulin beta-4B chain	0,028430	0,979224
	P99024	TBB5	Tubulin beta-5 chain	0,020165	0,239373
	<b>Q61879</b>	<b>MYH10</b>	<b>Myosin-10</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,123374</b>
	Q8VDD5	MYH9	Myosin-9	0,020921	0,056592
	Q9JHU4	DYHC1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	NA	0,001101
	Q9WTI7	MYO1C	Unconventional myosin-Ic	0,017249	0,007232
<b>Enzyme modulators</b>	<b>P62880</b>	<b>GBB2</b>	<b>Guanine nucleotide-binding protein G</b>	<b>NA</b>	<b>0,000650</b>
	P08752	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G	NA	0,000016
<b>Membrane traffic proteins</b>	<b>P51150</b>	<b>RAB7A</b>	<b>Ras-related protein Rab-7a</b>	<b>NA</b>	<b>0,009622</b>
	P07356	ANXA2	Annexin A2	0,017249	0,000071
	<b>P10107</b>	<b>ANXA1</b>	<b>Annexin A1</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,000005</b>
	P14824	ANXA6	Annexin A6	0,019419	0,000514
	P48036	ANXA5	Annexin A5	0,019419	0,000356
	P97429	ANXA4	Annexin A4	0,017249	0,000539
<b>Nucleic acid binding proteins</b>	P10126	EF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	0,020921	0,000116
	<b>P25444</b>	<b>RS2</b>	<b>40S ribosomal protein S2</b>	<b>NA</b>	<b>0,002087</b>
	<b>P27659</b>	<b>RL3</b>	<b>60S ribosomal protein L3</b>	<b>NA</b>	<b>0,000185</b>
	<b>P47911</b>	<b>RL6</b>	<b>60S ribosomal protein L6</b>	<b>NA</b>	<b>0,029233</b>
	P62242	RS8	40S ribosomal protein S8	NA	0,044312
	<b>P62754</b>	<b>RS6</b>	<b>40S ribosomal protein S6</b>	<b>NA</b>	<b>0,005354</b>
	P97351	RS3A	40S ribosomal protein S3a	NA	0,002228
<b>Protein disulfide-isomerases</b>	<b>P09103</b>	<b>PDIA1</b>	<b>Protein disulfide-isomerase</b>	<b>NA</b>	<b>0,000070</b>
	<b>P27773</b>	<b>PDIA3</b>	<b>Protein disulfide-isomerase A3</b>	<b>0,011412</b>	<b>0,000088</b>
	<b>Q922R8</b>	<b>PDIA6</b>	<b>Protein disulfide-isomerase A6</b>	<b>NA</b>	<b>0,041892</b>

<b>Protein with enzymatic activities</b>					
	<b>O88844</b>	<b>IDHC</b>	<b>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</b>	<b>NA</b>	<b>0,000335</b>
	<b>P05064</b>	<b>ALDOA</b>	<b>Fructose-bisphosphate aldolase A</b>	<b>0,017249</b>	<b>0,000009</b>
	<b>P06151</b>	<b>LDHA</b>	<b>L-lactate dehydrogenase A chain</b>	<b>NA</b>	<b>0,013003</b>
	<b>P08249</b>	<b>MDHM</b>	<b>Malate dehydrogenase, mitochondrial</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,135025</b>
	<b>P10852</b>	<b>4F2</b>	<b>4F2 cell-surface antigen heavy chain</b>	<b>NA</b>	<b>0,000143</b>
	<b>P14152</b>	<b>MDHC</b>	<b>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</b>	<b>NA</b>	<b>0,000845</b>
	P17182	ENOA	Alpha-enolase	0,020921	0,002185
	P17751	TPIS	Triosephosphate isomerase	NA	0,000173
	<b>P24270</b>	<b>CATA</b>	<b>Catalase</b>	<b>0,013238</b>	<b>0,000244</b>
	P28271	ACOC	Cytoplasmic aconitate hydratase	NA	0,000352
	<b>P35700</b>	<b>PRDX1</b>	<b>Peroxiredoxin-1</b>	<b>NA</b>	<b>0,000457</b>
	P41216	ACSL1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	0,020165	0,535444
	<b>P51660</b>	<b>DHB4</b>	<b>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,009675</b>
	P54310	LIPS	Hormone-sensitive lipase	NA	0,000352
	<b>Q00519</b>	<b>XDH</b>	<b>Xanthine dehydrogenase/oxidase Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</b>	<b>NA</b>	<b>0,019752</b>
	<b>Q8BMS1</b>	<b>ECHA</b>	<b>Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,242705</b>
	Q9EQ20	MMSA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	NA	0,025516
	<b>Q921H8</b>	<b>THIKA</b>	<b>3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal</b>	<b>NA</b>	<b>0,038326</b>
	<b>Q99LC5</b>	<b>ETFA</b>	<b>Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial</b>	<b>NA</b>	<b>0,001643</b>
<b>Transporter, transfer and carrier proteins</b>					
	<b>P51881</b>	<b>ADT2</b>	<b>ADP/ATP translocase 2</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,014987</b>
	P04117	FABP4	Fatty acid-binding protein, adipocyte	0,019419	0,002607
	<b>P48962</b>	<b>ADT1</b>	<b>ADP/ATP translocase 1</b>	<b>0,013238</b>	<b>0,195689</b>
	P56480	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	0,020165	0,543322
	Q03265	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0,017249	0,005161
	<b>Q8VDN2</b>	<b>AT1A1</b>	<b>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</b>	<b>NA</b>	<b>0,000770</b>
<b>Prohibitins</b>					
	<b>O35129</b>	<b>PHB2</b>	<b>Prohibitin-2</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,051735</b>
	<b>P67778</b>	<b>PHB</b>	<b>Prohibitin</b>	<b>0,047221</b>	<b>0,007444</b>

**Table 4 : Protéines spécifiquement enrichies dans les exosomes.** L'enrichissement de protéines dans les préparations de VE a été calculé sur la base de deux analyses (spectral counting ou XIC). La valeur *p* (représentative de la significativité) est présentée pour les deux types d'analyses. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 10^{-3}$ , avec la nécessité d'avoir une différence au moins de 5 spectres entre deux échantillons de VE pour valider l'enrichissement. Les protéines spécifiquement présentes dans les exosomes (et non détectées dans les MP) sont surlignées en gras.

				<i>p value</i>	
				Spectral counting	XIC
<b>Chaperones</b>	P80314	TCPB	T-complex protein 1 subunit beta	NA	0,016360
<b>Cytoskeleton related proteins</b>	P68368	TBA4A	Tubulin alpha-4A chain	NA	0,015584
<b>Enzyme modulators</b>	P68040	GBLP	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	NA	0,008871
<b>Extracellular Matrix proteins</b>	P02468	LAMC1	Laminin subunit gamma-1	NA	0,001072
	P10493	NID1	Nidogen-1	0,057547	0,001916
	<b>P11087</b>	<b>CO1A1</b>	<b>Collagen alpha-1</b>	<b>NA</b>	<b>0,000173</b>
	P11276	FINC	Fibronectin	0,017960	0,000338
	P37889	FBLN2	Fibulin-2	0,020921	0,000006
	P97927	LAMA4	Laminin subunit alpha-4	NA	0,002973
	Q02788	CO6A2	Collagen alpha-2	0,017960	0,000004
	Q04857	CO6A1	Collagen alpha-1	0,020921	0,000003
	Q07797	LG3BP	Galectin-3-binding protein	0,017960	0,000005
	<b>Q8CG85</b>	<b>MAMC2</b>	<b>MAM domain-containing protein 2</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,000314</b>
	Q99K41	EMIL1	EMILIN-1	0,017249	0,000080
	<b>Q9WVJ9</b>	<b>FBLN4</b>	<b>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2</b>	<b>0,013874</b>	<b>0,003746</b>
<b>Membrane traffic proteins</b>	Q68FD5	CLH1	Clathrin heavy chain 1	0,386476	0,000651
<b>Nucleic acid binding proteins</b>	P10853	H2B1F	Histone H2B type 1-F/J/L	NA	0,030182
	P62806	H4	Histone H4	NA	0,024638
	P14206	RSSA	40S ribosomal protein SA	NA	0,036252
	Q9EQK5	MVP	Major vault protein	0,019419	0,000000
<b>Metabolic enzymes</b>	P19096	FAS	Fatty acid synthase	0,663117	0,003210
	P97873	LOXL1	Lysyl oxidase homolog 1	NA	0,033005
	Q01853	TERA	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	NA	0,000783
	Q5SWU9	ACACA	Acetyl-CoA carboxylase 1	0,028430	0,000132
	Q05920	PYC	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	0,083265	0,708963
<b>Signaling molecules</b>	P11152	LIPL	Lipoprotein lipase	NA	0,001593
	Q60994	ADIPO	Adiponectin	NA	0,000850

Enfin, afin de valider cette analyse protéomique quantitative, nous avons analysé l'expression de deux protéines clés du métabolisme adipocytaire (adiponectine et aP2/FABP4), par western-blot, qui avaient déjà été identifiées dans d'autres études dans des préparations exosomales (Kralisch et al., 2014; Phoonsawat et al., 2014). En accord avec les données statistiques, nous détectons un enrichissement de l'adiponectine dans les exosomes, bien qu'elle soit aussi présente dans les autres populations de VE (Figure 32B). En outre, nous détectons une association spécifique d'aP2/FABP4, fortement exprimée dans les lysats cellulaires adipocytaires, avec les MP (Figure 32B), corroborant aussi notre analyse statistique (Table 3). Enfin, de manière analogue, la  $\beta$ -actine est spécifiquement associée aux MP (Figure 32B), toujours en accord avec notre analyse statistique des données protéomiques (Table 3), témoignant de l'importance du cytosquelette d'actine dans la biogenèse des MP. Bien que la validation de nos données de protéomique en western-blot soit encore en cours de réalisation, ces premiers résultats confirment la fiabilité de notre analyse protéomique permettant de conclure à l'enrichissement de protéines soit dans les MP, soit dans les exosomes.



**Figure 32 : Identification de protéines spécifiquement enrichies dans les MP ou les exosomes.**

A- Représentation schématique des familles de protéines retrouvées spécifiquement enrichies dans les MP (panel gauche) ou dans les exosomes (panel droit). Des exemples de protéines sont donnés à titre indicatif. La liste complète des protéines spécifiquement enrichies dans les MP et les exosomes est présentée dans les tables 3 et 4.

B- Confirmation de l'enrichissement de protéines d'intérêt métabolique par western-blot des différents sous-types de VE. CL : Cell lysate ; EV : extracellular vesicle; MP : Microparticle; Exo : Exosomes. La taille du marqueur de poids moléculaire est indiquée en kDa sur la droite.

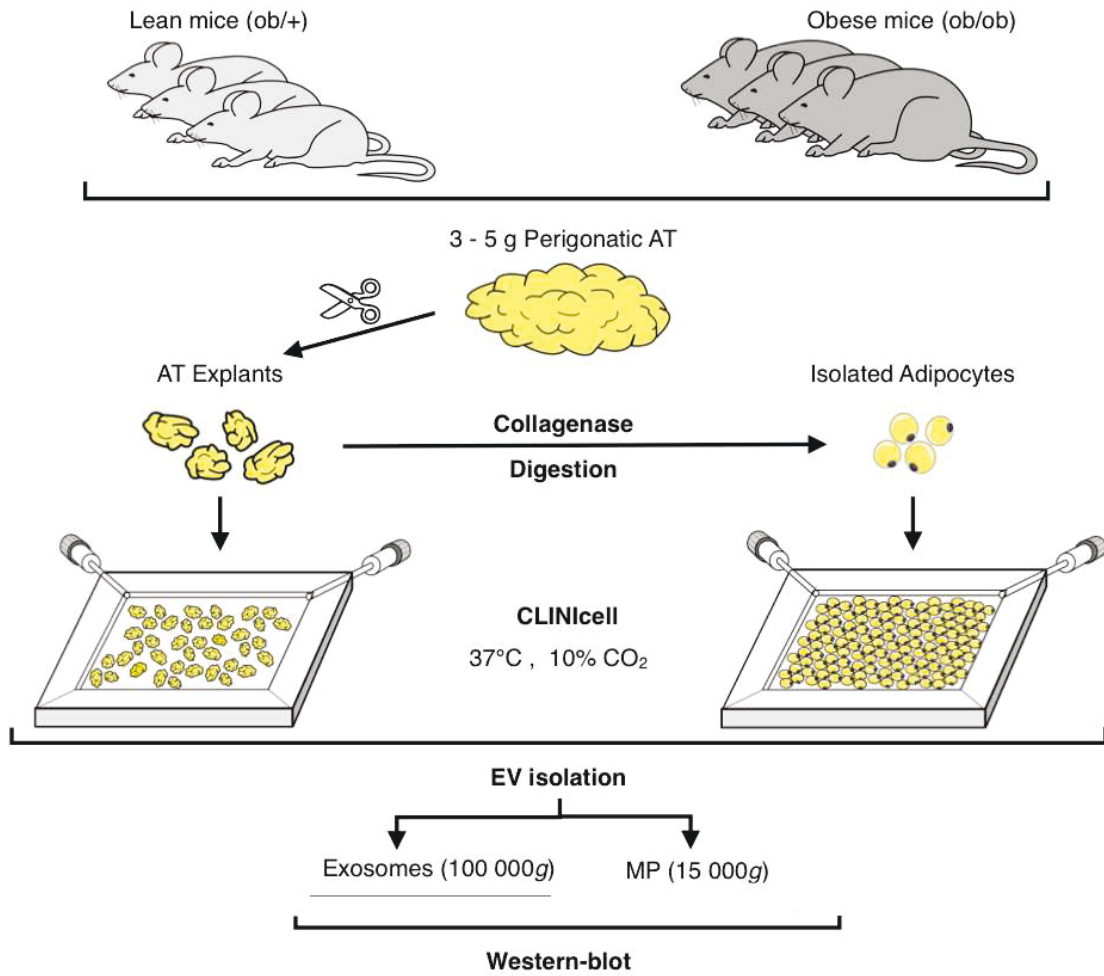
### **Quantification des VE sécrétées par les adipocytes isolés de tissus adipeux de souris contrôles ou obèses.**

Nous avons ensuite étudié la conséquence d'une élévation de la masse grasse sur la libération et la composition des VE libérés par le tissu adipeux. En utilisant la même procédure d'isolation de VE optimisée sur les adipocytes 3T3-L1, nous avons évalué la capacité d'adipocytes isolés *ex vivo* à partir de TA péri-gonadiques murins de souris (*ob/+*) à sécréter des MP et des exosomes, et l'avons comparé à la sécrétion de VE à partir d'explants de ces mêmes tissus (Protocole expérimental illustré Figure 33).

Sur la base d'une quantification protéique des VE isolées à partir des milieux conditionnés (en  $\mu\text{g VE/g TA}$ ), nous révélons la capacité des adipocytes isolés à sécréter les deux types de VE (exosomes et MP) de manière équivalente, à savoir entre  $9 \pm 2.3$  à  $14.13 \pm 0.3\mu\text{g de VE/g de TA}$  (Figure 34A). De plus, nous mesurons des quantités équivalentes d'exosomes et de MP isolés à partir des milieux conditionnés, qu'ils proviennent d'adipocytes isolés ou des explants de TA (Figure 34A). Ces résultats suggèrent donc que les adipocytes constituent la population cellulaire du TA qui contribue majoritairement à la sécrétion de VE, que ce soit de MP ou d'exosomes, dans le milieu extracellulaire.

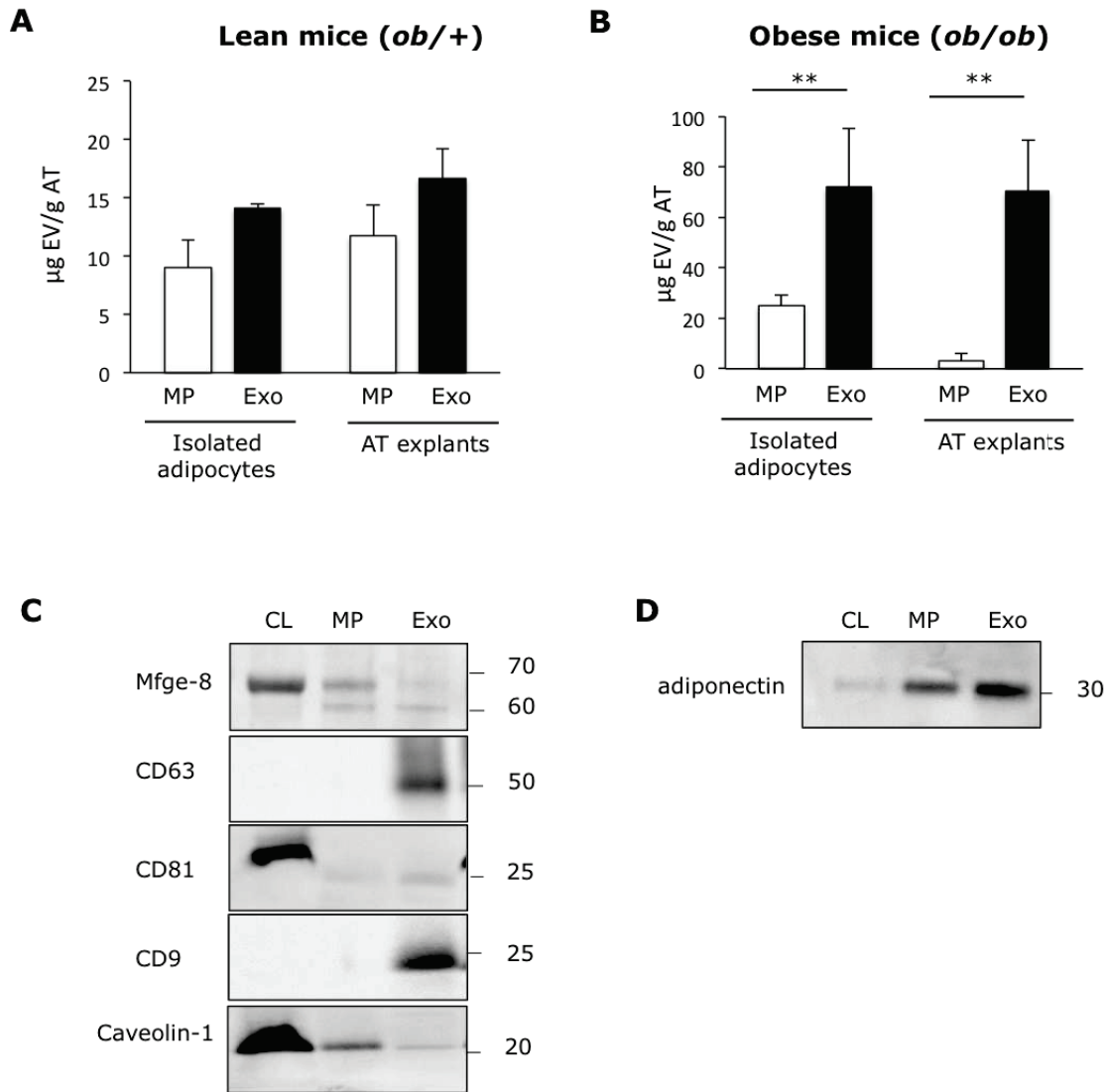
Nous avons, par la suite, comparé la sécrétion de MP et d'exosomes, isolés à partir de milieux conditionnés d'adipocytes isolés ou d'explants de TA de souris témoins (*ob/+*) (Figure 34A) ou obèses (*ob/ob*) (Figure 34B). Nous observons une sécrétion accrue des deux types de VE par les adipocytes hypertrophiques, de l'ordre de 3 fois supérieure pour les MP ( $25 \pm 4,3 \mu\text{g/g TA}$  pour les adipocytes *ob/ob* vs  $9 \pm 2.3 \mu\text{g/g TA}$  pour les adipocytes *ob/-*) et de 5 fois pour les exosomes ( $71.9 \pm 23 \mu\text{g/g TA}$  pour les adipocytes *ob/ob* vs  $14.13 \pm 0.3 \mu\text{g/g TA}$  pour les adipocytes *ob/-*) (Figure 34B). Dans ce contexte d'obésité, la population d'exosomes devient donc largement majoritaire comparé à celle des MP. De manière intéressante, les quantités de VE (exosomes ou MP) libérées par les explants de TA d'obèses restent similaire à celles libérées par les adipocytes isolées d'obèses, renforçant l'idée que les adipocytes contribuent majoritairement à la libération de VE retrouvées dans les milieux conditionnés (Figure 34B).





**Figure 33 : Procédure expérimentale d'isolation de VE ex vivo.** Représentation schématique de l'isolation des différents sous-types de VE a été réalisée à partir des surnageants de culture des explants de tissus adipeux ou d'adipocytes isolés de souris contrôles (*ob/+*) ou obèses (*ob/ob*).

Enfin, afin de savoir si les VE sécrétées par les adipocytes *ex vivo* présentaient des compositions similaires à celles que nous avons isolées à partir des adipocytes 3T3-L1, nous avons étudié l'expression de marqueurs protéiques à partir des VE d'adipocytes isolés de souris contrôles que nous avons préalablement montré associé aux MP et/ou exosomes (Figure 29). De manière similaire aux VE dérivées des 3T3-L1, nous retrouvons une association spécifique de Mfge-8 et de cavéoline-1 aux MP, tandis que les tétraspanines CD9, CD63 et CD81 sont principalement détectées dans les fractions exosomales (Figure 34C). Il est à noter que CD9 et CD63 sont particulièrement enrichis dans ces VE puisqu'indétectable, pour une même quantité de protéines déposée sur gel, dans les lysats d'adipocytes isolés. Enfin, nous retrouvons l'adiponectine dans les deux types de VE d'adipocytes isolés, avec cependant un enrichissement de cette adipokine dans les exosomes (Figure 34D).



**Figure 34 : Quantification et caractérisation biochimique des VE sécrétées par les adipocytes isolés et explants de tissu adipeux de souris contrôles (*ob/+*) ou obèses (*ob/ob*)**

A- Quantification de la sécrétion de VE (MP et exosomes) à partir d'adipocytes isolés et d'explants de tissu adipeux de souris contrôles (*ob/+*). Les résultats présentés correspondent à la moyenne  $\pm$  sem d'au moins n=3 expériences indépendantes, et sont exprimés en ug prot VE/ $\mu$ g tissu adipeux. MP : Microparticle; Exo : Exosomes.

B- Quantification de la sécrétion de VE (MP et exosomes) à partir d'adipocytes isolés et d'explants de tissu adipeux de souris obèses (*ob/ob*). Les résultats présentés correspondent à la moyenne  $\pm$  sem de n=3 expériences indépendantes. \*\* p<0.05

C- Western-Blot des différents marqueurs protéiques décrits pour être associés aux VE. CL : Cell lysate. La taille du marqueur de poids moléculaire est indiquée en kDa sur la droite.

D- Western-Blot de l'adiponectine dans les adipocytes isolés de souris contrôles (*ob/+*) précédemment décrite comme associée aux VE.

## Discussion et perspectives

***Les adipocytes sont capables de sécréter deux types de vésicules extracellulaires (VE) qui s'apparentent à des microparticules (MP) et à des exosomes.***

Au cours de cette étude, nous avons séparé les fractions correspondant aux MP et aux exosomes en utilisant un protocole se basant sur une série de centrifugations différentielles. Par microscopie électronique, nous détectons deux populations de vésicules qui réunissent les critères de taille et de structure (présence de double-membrane) respectivement décrits pour les MP et les exosomes. Cette analyse morphologique a été complétée par une analyse biochimique qui a permis de confirmer la présence de marqueurs protéiques, incluant des tétraspanines ou des marqueurs endo-lysosomaux pour les exosomes, et protéines membranaires pour les MP. Malgré des origines intracellulaires distinctes, il n'existe cependant pas de méthodologie permettant une séparation absolue des MP par rapport aux exosomes. En effet, des travaux suggèrent qu'il existerait des MP de très petite taille (<100 nm), qui de ce fait pourrait culotter avec les exosomes (Bobrie et al., 2012; Kranendonk et al., 2014a). De plus, on ne peut exclure une fusion des exosomes, conduisant à la formation de vésicules de plus grande taille, qui pourraient à l'inverse sédimenter avec la fraction MP. Enfin, les tétraspanines CD9, CD63 ou encore de la lactadhérine/Mfge-8 ont déjà été détectées dans des microvésicules culottant à faible vitesse, en plus de leur présence sur les exosomes, remettant en cause leur utilisation comme marqueurs spécifiques des exosomes (Bobrie et al., 2012). En accord avec ces données, nous trouvons un enrichissement spécifique de Mfge-8 dans les MP adipocytaires. En revanche, les tétraspanines CD9 et CD63 n'ont pas été identifiées par l'analyse protéomique, mais uniquement par western-blot où elles sont préférentiellement associées aux exosomes. La difficulté de détection des tétraspanines par spectrométrie de masse serait un problème récurrent du fait notamment de leur fort ancrage membranaire, et par conséquent de leur faible solubilité. L'ensemble de ces résultats démontre ainsi que la distinction entre MP et exosomes ne peut se limiter à une seule analyse biochimique de la présence de ces marqueurs protéiques. Ainsi, afin de caractériser au mieux nos populations de VE, nous envisageons de procéder à des analyses complémentaires incluant une analyse par 'Nanoparticle Tracking' ainsi qu'une analyse de la densité des ces deux populations de VE sur gradient de sucrose. Un faisceau de données provenant de méthodologies différentes est actuellement la seule stratégie proposée pour distinguer le plus clairement possible les MP des exosomes (Lötvall et al., 2014).

### **Identification de nouveaux marqueurs protéiques ?**

L'analyse de nos données protéomiques nous a permis de conclure à l'enrichissement de familles de protéines dans les MP ou dans les exosomes. De manière intéressante, certaines protéines ont été retrouvées exclusivement dans les MP ou les exosomes (identifiés en gras dans les tables 3 et 4). Ces protéines pourraient donc constituer des marqueurs exclusifs respectifs des populations de VE qui mériteraient d'être testés sur des populations de VE d'autres types cellulaires. Cependant, il est à noter que le contenu protéique des VE va aussi dépendre du type cellulaire, les cellules présentant elles-mêmes des profils d'expression protéiques différents. Ainsi, certaines de ces protéines, à l'image des enzymes fortement exprimées dans les adipocytes, seront peut être indétectables dans des VE dérivées d'autres cellules.

De manière intéressante, nous montrons que l'adiponectine est particulièrement enrichie dans la fraction exosomale, bien que présente aussi dans les MP. L'adiponectine est une cytokine insulino-sensibilisatrice et anti-inflammatoire sécrétée quasi-exclusivement par les adipocytes. Nos résultats suggèrent qu'une des voies de sécrétion de l'adiponectine pourrait être son association aux exosomes. Bien que la voie de sécrétion de l'adiponectine ait été précédemment décrite comme faisant intervenir un trafic *via* le RE et le Golgi, plusieurs travaux ont identifiés l'adiponectine dans des exosomes dérivés d'explants de TA (Deng et al., 2009) ou de préadipocytes humains différenciés *in vitro* (Kranendonk et al., 2014a). Cette sécrétion d'adiponectine par l'intermédiaire des VE serait de plus insensible à des agents inhibiteurs de la voie classique de sécrétion, telle que la Bréfeldine A (DeClercq et al., 2015). La forme circulante d'adiponectine associée spécifiquement à ces VE reste à déterminer. Enfin, la présence d'adiponectine sur des exosomes isolés à partir de sérum de rat (Phoonsawat et al., 2014) suggère que les VE adipocytaires puissent se retrouver dans la circulation sanguine. Ainsi, nous envisageons de mesurer les taux de MP et d'exosomes adiponectine-positifs à partir de prélèvement sanguins afin de déterminer la proportion des VE dérivées du TA. Cependant, l'expression de l'adiponectine est inversement corrélée à l'obésité, ce qui pourrait limiter son utilisation pour identifier les VE dérivées des adipocytes d'obèses.

### **Les VE dérivées du TA seraient majoritairement d'origine adipocytaire**

La comparaison entre les quantités de VE produites respectivement par les adipocytes primaires et les explants de TA sont similaires, suggérant que ce sont les adipocytes qui produisent la majorité des VE isolées à partir des milieux conditionnés. De plus, la quantité de VE sécrétée augmente considérablement dans un contexte d'obésité, en particulier la sécrétion d'exosomes. Nos résultats corroborent les données de la littérature où l'obésité (Deng et al., 2009) ou des stress cellulaires associés comme l'hypoxie (Sano et al., 2014) stimulent la production d'exosomes par des explants de TA.

Les exosomes ont principalement été impliqués dans la régulation des réponses inflammatoires (pour revue (Chaput and Théry, 2011)). Nos résultats suggèrent que les exosomes émis par les adipocytes pourraient contribuer à l'inflammation chronique de bas grade associée à l'obésité. Peu d'études cliniques se sont intéressées à mesurer les taux d'exosomes circulants dans le contexte des pathologies métaboliques. Compte tenu de la forte production d'exosomes par les cellules adipeuses hypertrophiées, il serait intéressant de quantifier les taux d'exosomes, porteurs ou non d'adiponectine et mettre ces données en relation avec les paramètres de l'état métabolique des patients.

***Les MP et les exosomes adipocytaires ont des compositions protéiques différentes laissant présager des fonctions différentes.***

Notre étude protéomique nous a permis de déterminer les enrichissements respectifs des MP et exosomes dérivés des adipocytes en certaines classes/familles de protéines, parmi lesquels on retrouve de nombreuses protéines régulatrices du métabolisme glucido-lipidique. Ainsi, les deux sous-types de VE sont enrichis en enzymes du métabolisme glucido-lipidique. Une étude préalable consacrée à la caractérisation des VE dérivées des hépatocytes avait déjà montré un tel enrichissement des VE en enzymes métaboliques (Rodríguez-Suárez et al., 2014) ou encore à partir de VE dérivées d'explants de TA (Deng et al., 2009). Plus particulièrement, on retrouve des enzymes régulant la synthèse des lipides comme la FAS ou ACC1 enrichies dans les exosomes. Ces enzymes clés de la lipogenèse ont été identifiées comme enrichies à la surface d'exosomes dérivant de 3T3-L1 soumis à des conditions de culture hypoxiques comparées à des conditions normoxiques (Sano et al., 2014). De plus, en comparaison à des exosomes adipocytaires « normoxiques », ces exosomes adipocytaires « hypoxiques » induisent une accumulation de lipides accrue lorsqu'incubés sur des adipocytes 3T3-L1 qui pourrait être lié à l'enrichissement d'ACC1 et de FAS (Sano et al., 2014).

En outre, on retrouve une association spécifique du transporteur de lipides aP2/FABP4 aux MP. Cette protéine, fortement exprimée par les adipocytes mais aussi par les macrophages, assure le transport des acides gras à longue chaîne carbonée et d'autres molécules hydrophobes tels que les sels biliaires et les rétinoïdes (pour revue (Bernlöhner et al., 1999)). De plus, son expression est très fortement induite au cours de l'obésité et elle jouerait un rôle majeur dans la résistance à l'insuline *via* la stimulation de la production de glucose hépatique (Cao et al., 2013). La présence d'aP2 avait déjà été révélée sur les VE dérivées d'explants de TA murin et humain (Deng et al., 2009; Kranendonk et al., 2014a). Néanmoins, la stimulation de la sécrétion d'aP2 en réponse à la ionomycine, suggérait que cette protéine soit associée principalement aux MP adipocytaires dont la genèse est liée au taux intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Kralisch et al., 2014). Nos travaux confirment donc un adressage spécifique de ce transporteur aux MP.

Enfin, parmi les protéines pouvant réguler le métabolisme-glucido-lipidique, les facteurs sécrétés jouent un rôle majeur dans le développement et la signalisation des altérations métaboliques. De manière surprenante, nous n'avons retrouvé aucune interleukine sécrétée *via* les VE adipocytaires. Parmi les quelques molécules de signalisation identifiées dans les VE, on retrouve l'adiponectine, la visfatine, Mfge-8/lactadhérine ainsi que des facteurs du complément (C3 et C4). Ces molécules de signalisation ont toutes été impliquées dans le développement d'altérations métaboliques en lien avec l'obésité, et pourraient donc participer aux réponses métaboliques du TA hypertrophié. En revanche, nous n'avons pas détecté la présence d'adipokines préalablement identifiées dans des exosomes dérivés d'adipocytes humains (résistine, RBP4, TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1 ou encore MIF) (Kranendonk et al., 2014) ou encore la leptine précédemment identifiée dans des exosomes d'adipocytes humains (Kranendonk et al., 2014a). Ces différences pourraient être liées au modèle cellulaire utilisé (la sécrétion de leptine par les 3T3-L1 étant très faible) ou à la méthodologie (la spectrométrie de masse étant moins sensible que le western-blot). Cependant, ces différences de contenu protéique suggère que, bien que les VE soient le reflet de leur cellule d'origine, l'adressage des protéines aux VE reste ciblée et régulée car seules certaines protéines utilisent cette voie de sécrétion.

Outre ces protéines susceptibles de réguler le métabolisme glucido-lipidique, on retrouve un enrichissement de protéines de la matrice extracellulaire dans les exosomes adipocytaires. A l'image du rôle des exosomes largement décrit dans la réponse inflammatoire en lien avec le développement de cancers ou de maladies neuro-dégénératives, ces exosomes dont la sécrétion est induite dans des TA murins obèses pourraient moduler l'inflammation du TA ou la fibrose hépatique, et plus largement l'état inflammatoire de bas-grade associé à l'obésité.

Concernant les MP, on retrouve un fort enrichissement en protéines adaptatrices 14.3.3, impliquées dans le trafic membranaire intracellulaire, en lien avec le remodelage du cytosquelette. Ainsi, la protéine 14.3.3 est nécessaire à la différenciation adipocytaire (Lim et al., 2015). De part son interaction avec les fibres d'actine, elles pourraient faire le pont avec des protéines du métabolisme adipocytaire telle la seipine/BSCL2 et ainsi participer au remodelage du cytosquelette nécessaire à la différenciation adipocytaire (Yang et al., 2014). Ainsi la présence de ces protéines, de même que les protéines Rab et annexines, témoignent de la capacité potentielle des VE à moduler le trafic cellulaire et les processus de différenciation en lien avec un remodelage du cytosquelette dans les cellules cibles.

Enfin, les MP se distinguent par leur enrichissement en chaperonnes (notamment de la famille des Hsp70 et 90) et en protéines disulfides isomérases qui sont liées aux

processus d'autophagie dépendant des chaperonnes. La présence de ces protéines rappelle le rôle de « poubelles de recyclage cellulaire » originellement décrit pour les MP (Wolf, 1967). Dans cette optique, ces MP pourraient participer à l'élimination de protéines ou composés cellulaires qui pourraient s'avérer délétères pour les adipocytes.

L'ensemble de nos données établit donc des profils protéiques différents entre les populations de MP et exosomes adipocytaires, probablement sujets à variation dans un contexte d'obésité. Ceci suggère que ces deux catégories de VE puissent déclencher des réponses métaboliques différentes à l'échelle de l'organisme. Nous envisageons donc d'étudier l'effet d'une incubation des MP ou des exosomes sur des cellules cibles dont le métabolisme est altéré dans un contexte d'obésité (adipocytes, hépatocytes, cellules musculaires). Plus particulièrement, nous étudierons leurs effets fonctionnels en terme de survie cellulaire, d'accumulation de lipides, de réponse inflammatoire ou de sensibilité à l'insuline. Enfin, il sera aussi intéressant de comparer aussi l'effet d'un même sous-type de VE (MP ou exosomes) provenant soit de TA sains ou obèses sur ces cellules cibles. L'ensemble de ces données nous permettra de tester dans quelle mesure ces VE pourraient participer au développement ou à la mise en place de complications métaboliques associées à l'obésité.





## Résultats expérimentaux II

# **Le morphogène Hh associé aux microparticules inhibe la différenciation adipocytaire *via* une voie de signalisation Hedgehog non-canonique**

### But du travail

La voie de signalisation Hh est impliquée dans de nombreux processus développementaux, ainsi que dans l'homéostasie tissulaire. Parmi ceux-ci, plusieurs travaux ont révélé le rôle majeur de ce morphogène au cours de l'adipogenèse (Pospisilik et al., 2010; Suh et al., 2006). Plus récemment, des travaux ont mis en évidence que les ligands Hh peuvent moduler le métabolisme d'adipocytes matures, notamment en activant la protéine Ampk (Teperino et al., 2012). L'ensemble de ces données a été généré suite à l'utilisation de la protéine recombinante Shh non-lipidée ou des agonistes classiques de Smo activateurs de la signalisation Hh (SAG, purmorphamine). Cependant, la liaison des lipides à Hh est nécessaire dans sa diffusion et potentialise son activité (Grover et al., 2011; Long et al., 2015). De plus, Hh peut diffuser dans le milieu extracellulaire associé aux VE probablement dans sa forme lipidée.

De manière intéressante, des données récentes suggèrent que l'association de ce morphogène à des VE pourrait potentialiser ses effets dans les cellules cibles (Vyas et al., 2014). De plus, notre laboratoire a montré que les MP<sup>Hh+</sup> sont capables d'induire l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales (Soleti et al., 2009) contrairement à la protéine recombinante Shh (Chinchilla et al., 2010; Renault et al., 2010).

Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à comparer les effets dans les cellules cibles de la protéine recombinante non lipidée ou de la forme mature lipidée monomérique avec la forme de Hh associée aux MP.

Dans ce contexte, le but de cette deuxième partie de mon travail de thèse a été de comparer les effets de VE portant Hh à ceux de la protéine Shh rec ou aux agonistes de Smo sur la différenciation adipocytaire. Pour cela, nous avons utilisé un modèle cellulaire développé au laboratoire (Martínez et al., 2006). Ce modèle repose sur l'activation cellulaire, grâce à une combinaison de stimuli apoptotiques et prolifératifs, d'une lignée de lymphocytes T humains. Ces lymphocytes activés libèrent alors des MP porteuses du morphogène Shh.

## Résultats

Dans ce travail, nous montrons que les MP<sup>Hh+</sup> inhibent la différenciation adipocytaire de cellules 3T3-L1 murines, mais également de cellules mésenchymateuses humaines, en accord avec une activation de la signalisation Hh dans les cellules cibles. Cette inhibition de l'adipogenèse, caractérisée par une inhibition de nombreux facteurs adipogéniques, peut être réversée par la surexpression de PPAR $\gamma$  démontrant que les MP<sup>Hh+</sup> agissent à une phase précoce de la différenciation adipocytaire. Bien que ces effets inhibiteurs soient dépendants de l'activation du récepteur Smo, ils diffèrent de ceux induits par le SAG ou Shh rec car sont indépendants des facteurs Gli. En revanche, l'effet des MP<sup>Hh+</sup> peut être reproduit par l'agoniste nouvellement caractérisé de Smo, le GSA-10 (Gorojankina et al., 2013), qui induit aussi une inhibition de la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 en stimulant une voie de signalisation Hh non-canonique. L'induction de cette voie non-canonique par les MP<sup>Hh+</sup> et le GSA-10 pourrait être médiée par la stabilisation d'une forme de Smo spécifique, uniquement antagonisée par le LDE225, mais insensible à d'autres antagonistes de Smo tels que la cyclopamine, SANT-1, GDC-0449 ou encore MRT-92. Enfin, l'inhibition de l'adipogenèse induite par les MP<sup>Hh+</sup> et le GSA-10 fait intervenir un axe Smo/Lkb1/Ampk. Dans les préadipocytes, l'activation de cette nouvelle voie de signalisation non-canonique, Smo/Lkb1/Ampk, entraîne une inhibition de la différenciation adipocytaire.

## **Hedgehog associated to microparticles inhibits adipocyte differentiation *via* a non-canonical pathway**

Audrey Fleury<sup>1</sup>, Lucile Hoch<sup>2</sup>, M. Carmen Martinez<sup>1</sup>, Hélène Faure<sup>2</sup>, Maurizio Taddei<sup>3</sup>, Elena Petricci<sup>3</sup>, Fabrizio Manetti<sup>3</sup>, Nicolas Girard<sup>4</sup>, Andr e Mann<sup>4</sup>, Caroline Jacques<sup>1</sup>, Jérôme Larghero<sup>5</sup>, Martial Ruat<sup>2</sup>, Ramaroson Andriantsitohaina<sup>1</sup> and Soazig Le Lay<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1063, Université d'Angers, IBS-IRIS Rue des Capucins, F-49100 Angers

<sup>2</sup> CNRS, UMR-9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, Molecules Circuits Department, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198, Gif sur Yvette, France.

<sup>3</sup> Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia, Université degli Studi di Siena, Via A. Moro 2, I-53100, Siena, Italy.

<sup>4</sup> CNRS, UMR-7200, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, 74 Route du Rhin, BP 60024, F-67401 Illkirch, France.

<sup>5</sup> Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Louis, Unité de Thérapie Cellulaire; Inserm UMR1160 et CIC de Biothérapies; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75475, Paris, France.

\*Author for Correspondence:

Soazig Le Lay, PhD

INSERM UMR 1063 "Oxidative stress and metabolic pathologies", Institut de Biologie en Santé

4 rue Larrey

F-49933 Angers

France

Phone: +33 2 44 68 85 81/Fax: + 33 2 44 68 85 85

E-mail: soazig.lelay@inserm.fr

Running title : Adipogenesis inhibition by microparticles harboring hedgehog

6 Figures; 5 Supplementary Figures; 1 Supplementary Table

Words count: Title (100 characters including spaces); Abstract (147 words); Main text excluding references (36 746 characters without spaces)

## **Abstract**

Hedgehog (Hh) is a critical regulator of adipogenesis. Extracellular vesicles are natural Hh carriers, as illustrated by activated/apoptotic lymphocytes specifically shedding microparticles (MP) bearing the morphogen (MP<sup>Hh+</sup>). We show that MP<sup>Hh+</sup> inhibit adipocyte differentiation and orientate mesenchymal stem cells towards a pro-osteogenic program. Despite a Smoothened (Smo)-dependency, MP<sup>Hh+</sup> anti-adipogenic effects do not activate a canonical Hh signalling pathway in contrast to those elicited either by the Smo agonist SAG or recombinant Sonic Hedgehog. The Smo agonist GSA-10 recapitulates many of the hallmarks of MP<sup>Hh+</sup> anti-adipogenic effects. LDE225 is the only Smo antagonist found to prevent the adipogenesis blockade induced by MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10. We further elucidate a Smo/Lkb1/Ampk axis as the non-canonical Hh pathway used by MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 to inhibit adipocyte differentiation. Our results highlight for the first time the ability of Hh-enriched MP to signal *via* a non-canonical pathway opening new perspectives to modulate fat development.

148 words

## Introduction

The conserved family of Hedgehog (Hh) proteins, including Desert (Dhh), Indian (Ihh) and Sonic (Shh), are secreted signalling morphogens of crucial importance in the control of tissue patterning, cell growth and differentiation during development [1]. Hh is also expressed in adult tissues where it participates to physiological and pathophysiological responses [2]. Mature Hh proteins are produced as precursors that are processed through autocatalytic cleavage. This yields a secreted N-terminal peptide further modified by covalent attachments of a cholesterol molecule at its C-terminus [3] and a palmitic acid at its N-terminus [4]. These adducts confer a high affinity for lipid-modified Hh with the plasma membrane triggering a local and high level of signalling response (for review [5]). Hh activates signalling cascade into targeting cells by binding to the multipass membrane receptor Patched (Ptch). Other Hh binding proteins, including putative co-receptors for Hh ligands, are also identified to be mandatory for correct Hh pathway activity in multiple tissues [6]. Hh binding to Ptch leads to derepression of Smoothed (Smo), a member of the class F GPCR (G-protein coupled receptors) [7]. Active Smo translocates to the tip of the primary cilium and prevents the proteolytic cleavage of the Gli1 to -3 transcription factors allowing their nuclear translocation and regulation of their target genes [8]. While this canonical Hh pathway regulates the majority of the biological effects of Hh signalling, other non-canonical pathways, independent of Gli but still relying on Smo were reported [7, 9, 10]. Hh ligands can then promote cytoskeleton rearrangement through a Smo-RhoA-Rac1 coupling mechanism in endothelial cells [11, 12]. In neurons, these ligands modulate  $Ca^{2+}$  spike activity through Smo-heterotrimeric GTP-binding protein-dependent pathway [9]. They can also stimulate axon guidance through Src kinases activation *in vitro* [13]. Recently, Teperino *et al.* revealed the pivotal role of a Smo-Ampk (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) in the regulation of cellular metabolism, notably through increased insulin-independent glucose uptake in brown fat tissue and muscle [14]. Our previous identification of the Smo modulator propyl 4-(1-hexyl-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamido) benzoate (GSA-10), which mediates its cellular effects independently of cilium Smo translocation and Gli activation [15], highlights the fact that, depending on ligands, different Smo conformations signal through various downstream pathways.

Since membrane tethering of double-lipid modified Hh peptides precludes direct effects on distant cells, several mechanisms contribute to ligand release and subsequent transport. Although lipid-free Hh forms are detected at low levels *in vivo* [16], the main Hh form detected in most species is cholesterol-modified lipid adduction that conditions its long-range spreading [17]. Hence, circulating lipidated forms of Hh have also been detected as soluble multimeric protein complexes [18], or shown to associate with lipoproteins [19, 20] and to extracellular vesicles (EV) including exosomes and microparticles (MP) [17, 21-25]. Interestingly, others and we demonstrated that MP-associated Hh ligands triggered Hh signalling in endothelial cells inducing pro-angiogenic responses [24, 26] and preventing apoptotic processes [27, 28]. Moreover, intravenous injection of Hh-enriched MP (MP<sup>Hh+</sup>) in ischemic rodent models confirm their pro-angiogenic potential [27, 29] as well as their cardioprotective effects [30] shedding light on the therapeutic potential of these MP<sup>Hh+</sup> in cardiovascular diseases [31].

Among the numerous biological effects reported for Hh morphogens [2, 32], Shh was identified as a critical regulator of fat development by altering white adipocyte differentiation [33, 34]. Activation of Hh signalling in mesenchymal stem cells indeed favours osteoblastic differentiation at the expense of adipogenesis [35]. Whereas the molecular basis underlying these anti-adipogenic effects are not fully elucidated, Shh seems to act on early steps of adipocyte differentiation, through the modulation of key Gli-dependent transcriptional regulators [34], upstream to peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) [33]. Hh effects on adipogenesis are all based on the response obtained by recombinant protein (recShh) or the use of Smo agonists such as SAG and purmorphamine that stimulate the Hh canonical pathway [33, 34].

In the current report, we study the effects of MP either harbouring Hh ligands or devoid of them (MP<sup>Hh+</sup> and MP<sup>Hh-</sup>, respectively) isolated from cultured supernatants of apoptotic/stimulated T-lymphocyte cells [22]. We show here that MP<sup>Hh+</sup> specifically inhibit adipocyte differentiation. Despite similar anti-adipogenic effects, MP<sup>Hh+</sup> differ from recShh or SAG by activating a different downstream signalling pathway independent of the transactivation of Gli factors. We reveal that MP<sup>Hh+</sup> anti-adipogenic effects, which can be partially mimicked by the Smo agonist GSA-10, rely on

the activation of a Smo/Lkb1 (Liver kinase B1)/Ampk axis. These results highlight, for the first time, the ability of Hh-enriched MP to signal *via* a non-canonical pathway to inhibit adipocyte differentiation.



## Results

### *MP carrying Hh (MP<sup>Hh+</sup>) specifically inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation*

MP harbouring membrane-derived Hh morphogen were isolated from supernatants of CEM T lymphocytic cells following PHA/PMA/ActD treatment, as previously described [22]. Western blot analysis revealed that these activated/apoptotic lymphocytes specifically shed MP bearing Hh (MP<sup>Hh+</sup>), whereas apoptotic-T lymphocytic cells secreted MP that do not carry this morphogen (MP<sup>Hh-</sup>) when stimulated with ActD alone (Fig.1A).

The concentration-response to CEM T-derived MP on adipocyte differentiation was conducted in 3T3-L1 cells differentiated according to a classical induction protocol (see methods) upon addition of these MP at each medium change (every two days). We first checked that MP<sup>Hh+</sup> treatment at the highest concentration tested (10 µg/mL) did not affect cell viability as investigated by the MTT test (Fig.1B). In contrast, it significantly increased the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes (Fig.1C). Exposure of 3T3-L1 preadipocytes to 10 µg/mL MP<sup>Hh+</sup> specifically inhibited adipocyte conversion as illustrated by decreased Oil Red O staining (Fig.1D). The concentration of 10 µg/mL MP<sup>Hh+</sup> was the most effective since treatment of 3T3-L1 with lower doses of MP<sup>Hh+</sup> displayed less inhibitory potential (Fig.S1A). However, 10 µg/mL MP<sup>Hh-</sup> did not affect 3T3-L1 adipogenesis at any of the tested concentrations (Fig.1D, Fig.S1A) thereby excluding an inhibitory effect of MP treatment. Exosomes isolated from MP-depleted supernatants of PHA/PMA/ActD-treated CEM T lymphocytic were devoid of Hh (Fig.S1B) and did not inhibit adipocyte differentiation (Fig.S1C). We also established that a single treatment of 3T3-L1 with 10 µg/mL MP<sup>Hh+</sup> during the induction phase of adipocyte differentiation was sufficient to obtain the maximal inhibitory effect on lipid accumulation (Fig.1E), suggesting that MP<sup>Hh+</sup> act at the early stages of adipogenesis. Nuclease-pretreatment of MP<sup>Hh+</sup> did not prevent their inhibitory effects demonstrating that the anti-adipogenic effect triggered by MP<sup>Hh+</sup> were independent of nucleic acids transfer from MP (Fig.1F).

Adipogenesis inhibition following MP<sup>Hh+</sup> exposure was associated with a marked reduction of mRNA expression of key adipogenic transcription factors, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , and the terminally differentiated marker aP2, whereas C/EBP $\beta$  mRNA expression remained unmodified (Fig.1G).

Conversely, mRNA expression levels of anti-adipogenic markers like Pref-1, Coup-TFII and GATA-2

were specifically induced by MP<sup>Hh+</sup> treatment (Fig.1G). In line with this, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and aP2 proteins levels were specifically decreased while Pref-1 protein levels increased following MP<sup>Hh+</sup>. Incubation with MP<sup>Hh-</sup> in contrast, did not modify the protein expression of these key adipogenic factors (Fig.1H) and did not change the mRNA expression of both adipogenic and non-adipogenic markers (Fig.1G). Finally, MP<sup>Hh+</sup> were ineffective in blocking adipogenesis in 3T3-L1 stably overexpressing PPAR $\gamma$ , suggesting that MP<sup>Hh+</sup> trigger anti-adipogenic events upstream of PPAR $\gamma$  (Fig.1I). Hence, Hh-association to MP triggers specific inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by acting at early stages, upstream of PPAR $\gamma$  activation.

*MP<sup>Hh+</sup> induce a pro-osteogenic program in human mesenchymal stem cells.*

Since CEM T cells are of human origin, we wanted to exclude the possibility that the inhibitory phenotype observed following treatment of murine 3T3-L1 with MP<sup>Hh+</sup> was the result of inter-species reactivity responses. We therefore investigated the effect of MP<sup>Hh+</sup> on a human model of adipocyte differentiation, namely human mesenchymal stem cells (hMSCs) cultured in adipogenic conditions. As shown in Fig.2A, MP<sup>Hh+</sup> also interfered with hMSCs-adipocyte differentiation compared to vehicle or MP<sup>Hh-</sup> treatment. Similar to 3T3-L1, decreased PPAR $\gamma$  and aP2 protein expression levels evidenced adipogenesis blockade in hMSCs (Fig.2B). Since Hh influences the balance between adipogenesis and osteogenesis, we investigated whether MP<sup>Hh+</sup> could promote an osteogenic program in these hMSCs. Despite the adipogenic culture conditions, MP<sup>Hh+</sup> treatment induced a significant increase in Runx2 mRNA expression, an early transcription factor in osteogenesis (Fig.2C). In line with this, MP<sup>Hh+</sup> incubation induced an elongated osteoblast-shape phenotype (see Fig.2A) that was associated with an increase in alkaline phosphatase (ALP) activity (Fig.2D). Altogether, these results confirm that Hh influences the balance between adipogenesis and osteogenesis even in its MP-associated form.

*Adipogenesis inhibition mediated by MP<sup>Hh+</sup> is independent of Gli transcription factors.*

Our data show that MP<sup>Hh+</sup> inhibit adipogenesis in classical induction medium containing key inducers of differentiation, namely phosphodiesterase inhibitor isobutylmethylxanthine (IBMX) and dexamethasone (Dex). However, previous studies established that IBMX and Dex interfere with Hh

signalling abolishing the anti-adipogenic effect of the canonical Smo agonist SAG or the recombinant Shh protein (recShh) [33, 34] notably by decreasing Gli1 expression, a key transcriptional relay for canonical Hh signalling activity [34, 36]. We then compared the effects of Hh pathway modulators (recShh, SAG, purmorphamine, GSA-10) to that of MP<sup>Hh+</sup> on 3T3-L1 adipogenesis in classical induction medium or minimal induction medium (only containing Rosiglitazone and Insulin). Treatment of 3T3-L1 with 200 nM SAG, 10  $\mu$ M purmorphamine or 0.5  $\mu$ g/mL recShh had no effect on adipocyte differentiation in the classical induction medium (Fig.3A). Inhibitory properties of these Hh canonical inducers were only observed in the minimal induction medium (Fig.3A), 10nM SAG is sufficient to inhibit adipocyte differentiation in these culture conditions (Fig.S2A). Addition of IBMX or Dex to minimal induction medium was sufficient to abolish SAG and recShh inhibitory effects on adipogenesis while MP<sup>Hh+</sup> retained their complete inhibitory activity (Fig.S2B). Conversely, GSA-10 treatment of 3T3-L1 inhibited differentiation in classical as well as minimal induction medium similar to MP<sup>Hh+</sup> treatment (Fig.3A), with maximal effect reached at 10 $\mu$ M (Fig.S2A). Moreover, MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 were able to overcome the effect of the presence of IBMX/Dex (Fig.S2B). Thus, the conserved inhibitory potential of MP<sup>Hh+</sup> in classical induction medium could be mimicked by GSA-10, but not by the Smo agonist SAG or the recombinant Hh protein.

We found that MP<sup>Hh+</sup>, like GSA-10, also failed to enhance Gli-reporter activity in Shh-Light2 cells in comparison to SAG (Fig.3B). Moreover, real-time qPCR analysis of Gli target genes (including *Gli1* and *Ptch*) revealed a strong induction in minimal induction medium following SAG and recShh stimulation (10-40 fold increase) (Fig.3C). In contrast, MP<sup>Hh+</sup> did not increase the transcription of these two genes, similar to GSA-10. Instead GSA-10 decreased *Gli1* mRNA expression in accordance to what we previously described in C3H10T1/2 cells [15] (Fig.3C). Canonical Hh signalling, initiated by Hh binding to Ptch, precedes Smo accumulation in the primary cilium and the activation of downstream Gli transcription factors [32]. We first studied whether treatment with MP<sup>Hh+</sup> or Smo agonists alter the dynamics of the cilium present in 3T3-L1 cells by visualizing the acetylated tubulin-positive signal. As previously described [37], we confirmed the transient presence of a cilium in preconfluent preadipocytes (day 2) and during the induction phase of differentiation (day 0/day 1/day 3) followed by its disappearance in fully differentiated adipocytes (day 6) (Fig.S3A). Thus, neither

MP<sup>Hh+</sup>, SAG, nor GSA-10 treatment affected the presence of this cilium in preadipocytes (Fig.S3B) excluding the possibility that the differential responses of MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10, by comparison to SAG, may rely on an alteration of this sensory organelle.

We next questioned about Smo requirement in MP<sup>Hh+</sup> mediating effects. Knockdown of Smo reversed the anti-adipogenic effects of SAG but also the effects of MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 on 3T3-L1 cultured in minimal induction medium (Fig.3D). These data clearly establish that MP<sup>Hh+</sup>, like SAG or GSA-10, stimulate Smo activity to exert their inhibitory properties. However, MP<sup>Hh+</sup>, like GSA-10, mediate their anti-adipogenic effects independently of the increased transcription of *Glil*, suggesting the activation of a non-canonical Hh pathway.

The neutralizing monoclonal antibody 5E1 (5E1 Ab) binds Hh at its pseudo-active site thereby preventing Hh binding to Ptch and antagonizing the ligand-dependent pathway activation [38]. To investigate whether such binding between MP<sup>Hh+</sup> and Ptch is necessary to mediate anti-adipogenic effects, we treated 3T3-L1 cells with 10 µg/mL MP<sup>Hh+</sup> or recShh preincubated in the presence or absence of 5E1 Ab. Preincubation of recShh with 5E1 Ab completely abolished the anti-adipogenic potential of the recombinant protein illustrating the requirement of recShh binding to Ptch for mediating adipogenesis blockade (Fig.3E). Surprisingly, preincubation of MP<sup>Hh+</sup> with Hh neutralizing Ab did not alter their anti-adipogenic potential (Fig.3E). Using PKH26 labelled-MP<sup>Hh+</sup>, we further demonstrated the ability of 3T3-L1 to rapidly internalize MP<sup>Hh+</sup>, with more than half of MP<sup>Hh+</sup> already detected in intracellular compartments after 6 hours of incubation (Fig.S4A). Labelled-MP<sup>Hh+</sup> uptake, visualized by confocal microscopy over time, was prevented by incubating the cells at 4°C suggesting an energy-dependent process rather than a passive membrane passage (Fig.S4B). Moreover, excess of unlabelled MP<sup>Hh+</sup> prevented the internalization of PKH26 labelled-MP<sup>Hh+</sup> in 3T3-L1 cells supporting the specificity of this process (Fig.S4C). Finally, we observed no effect of 5E1Ab preincubation on PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> uptake investigated at 24 h in 3T3-L1 cells (Fig.S4D) suggesting that the MP internalization process is independent of a direct binding of Patched to Hh carried by MP. Altogether, these results demonstrate that MP<sup>Hh+</sup> neither bind to Ptch *via* the Hh pseudo-active site to inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation nor do they use this receptor for internalization by 3T3-L1 cells.

### *MP<sup>Hh+</sup> and RecShh exhibit distinct pharmacology of Smo*

To further characterize MP<sup>Hh+</sup> activation of Smo, we investigated whether effects on 3T3-L1 cell differentiation could be inhibited by Smo antagonists with different chemical structures (cyclopamine, GDC-0449, SANT-1, MRT-92, LDE225) [7, 39, 40]. Noteworthy, antagonists tested were described to bind to different sites of Smo: cyclopamine, GDC-049 and LDE225 mostly bind to the 3<sup>rd</sup> extracellular loops (ECL) of Smo (referred to as site 1) whereas SANT-1 binds to a narrow and deep hydrophobic cavity in its 7 transmembrane (TM) domain namely site 2 [7, 40, 41]. Of note, we recently described binding of MRT-92 to both sites [40]. None of the tested antagonists altered the basal 3T3-L1 adipocyte differentiation (Fig.4A). Of interest, anti-adipogenic effects of SAG and recShh in minimal induction medium were completely antagonized by all Smo antagonists tested as illustrated by the reversion of lipid accumulation (Fig.4A-B). Conversely, none of Smo site 1 and site 2 binding antagonists prevented MP<sup>Hh+</sup> or GSA-10 anti-adipogenic effects. Interestingly, LDE225, in contrast to the other tested antagonists, prevented the inhibitory effect of MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 on adipocyte differentiation (Fig.4A-B). Results similar to those of cyclopamine were obtained with its analog KAAD-cyclopamine (10  $\mu$ M, data not shown). Such differential antagonism suggest that MP-associated Hh may act through a Smo conformation analog that binds GSA-10 and not through a Smo conformation linked to the canonical pathway activated by SAG or recShh.

### *Anti-adipogenic effects of MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 are mediated by a Smo/Lkb1/Ampk pathway*

We next investigated which signalling pathways downstream of Smo were involved in MP<sup>Hh+</sup> adipogenesis inhibitory effects. We therefore searched for mechanisms described for modulating adipogenesis with a link to Hh signalling.

First, we studied autophagy in response to MP<sup>Hh+</sup> since this process was shown to be required for adipocyte conversion [42, 43], and is a crucial node for Hh signalling [44, 45]. We analysed the flux through the autophagy pathway using bafilomycin-A1 (BafA1), a blocker of lysosomal degradation, by measuring changes in the levels of lipid-modified LC3 form, namely LC3-II. It is an autophagosome component degraded in lysosomes (Fig.S5A). Since LC3-II/LC3-I ratios were not significantly different after 10 $\mu$ g/mL MP<sup>Hh+</sup> exposure in the presence or absence of BafA1 (Fig.S5B),

we concluded that MP<sup>Hh+</sup> did not modify the basal autophagic process or the autophagic flux in 3T3-L1 cells.

Second, we focused on the activation of Ampk since a Smo-Ampk axis was recently identified to mediate Hh metabolic responses in adipose and muscular cells [14]. Of note, Ampk activation as well as its upstream kinase Lkb1 were both shown to reduce adipogenesis [46-48]. Indeed, we observed a robust phosphorylation of Ampk following 24h treatment of 3T3-L1 preadipocytes with MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10, but not with SAG or recShh (Fig.5A). To further characterize the involvement of Ampk signalling in adipogenesis inhibition by MP<sup>Hh+</sup>, we generated knockdown of key kinases implicated in Ampk signalling. Despite many trials, we were unable to produce an efficient knockdown of Ampk. We therefore turned towards upstream kinases Lkb1 and Camkk2 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2), which have Ampk as the main substrate and are both involved in the non-canonical Smo/Ampk axis identified in adipocytes [14]. Efficient knockdown (Kd) of Lkb1 abrogated MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 effects on adipocyte differentiation (Fig.5B). In contrast, MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 maintained their inhibitory effects on adipogenesis in Camkk2 Kd cells (Fig.5B). Accordingly, *PPAR $\gamma$*  and *aP2* mRNA expression were restored in MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10-treated Lkb1 Kd cells (Fig.5C), whereas they were still decreased in Camkk2 Kd adipocytes (Fig.5D). It is noteworthy that the anti-adipogenic effects of SAG and recShh in minimal induction conditions were independent of Lkb1 or Camkk2, as illustrated by the conserved inhibition of *PPAR $\gamma$*  and *aP2* mRNA expression in Lkb1 and Camkk2 Kd cells (Fig.5C and 5D). Altogether, these results demonstrate that the anti-adipogenic effects of MP<sup>Hh+</sup> or GSA-10 in 3T3-L1 preadipocytes is mediated *via* the activation of a Smo-Lkb1-Ampk pathway, previously evidenced in mature 3T3-L1 adipocytes [14].

## Discussion

Adipogenesis, contributing to fat development, is one of the numerous developmental processes controlled by Hh signalling. In this work, we investigated the effect of MP-associated Hh (MP<sup>Hh+</sup>) on adipogenesis by studying their effects on the well-described 3T3-L1 adipocyte differentiation model. We show that MP<sup>Hh+</sup> trigger potent inhibition of adipocyte conversion similar to the inhibitory effects of non-lipidated form of Hh using recShh or the Smo agonists SAG and GSA-10. However, we also demonstrate that MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 specifically use a non-canonical pathway involving a Smo/Lkb1/Ampk axis to exert their anti-adipogenic effects, unlike recShh or SAG whose effects rely on Gli-dependent transcriptional activity (Fig.6).

Different secreted forms of Hh morphogen are described in mammalian systems in particular, the EV-associated Hh forms, including exosomes and MP [17, 21-25, 49]. While MP refer to 150-1000 nm vesicles secreted following budding from the plasma membrane, exosomes indicate smaller vesicles (30-100 nm) released as a consequence of the fusion of multivesicular bodies with the cell surface. In our cellular model, we selectively target Hh to MP fraction secreted by T-CEM lymphocytes following apoptotic/activated stimuli, but not exosomes. Other authors also reported specific association of Hh on MP in hepatic stellate cells following specific activation signals [24], suggesting that they can participate in pathophysiological responses to cell damages. No information is yet available regarding the Hh forms associated to MP. Since MP-associated Hh is derived from cellular plasma membranes, this suggests the presence of doubly-lipid modified Hh forms on MP. By analogy, lipoproteins released by flies or mammalian cell types contain lipid-modified forms of the morphogen [20]. Lipid modifications are required for cellular reception and influence both cellular concentration of Hh ligands and signalling potency [17, 50]. However, recent work demonstrated that endogenous-derived Hh morphogens are modified by a heterogeneous subset of saturated and unsaturated fatty acids, which would influence their subcellular trafficking and activity [51]. Since MP are thought to be derived from lipid-enriched plasma membrane microdomains, the so called lipid-rafts [52, 53], which are highly enriched in saturated fatty acids, such membranous origin might influence fatty-acid speciation of Hh forms associated to MP.

In our model, in contrast to recShh, preincubation with 5E1 Ab did not antagonize either the anti-adipogenic effects of MP<sup>Hh+</sup> or MP<sup>Hh+</sup> internalization by preadipocytes. This suggests that MP-associated Hh do not use the Hh-pseudo active site to bind to Ptch and activate the downstream Smo in 3T3-L1 cells. We can however not exclude the possibility that these MP<sup>Hh+</sup> could bind to Ptch at a site, which is not fully antagonized by 5E1 Ab. Hh signalling also depends on the combinatorial involvement of several co-receptors in addition to its cognate primary Ptch receptor [6]. Presence of co-receptors like proteoglycans and Lrp2 on a specific pool of exosomes was proposed to modify Hh signalling outcomes [25]. Similarly, accessory proteins like integrins, often retrieved on extracellular vesicles, would be necessary for the full signalling capability of Hh [25]. Finally, internalized MP<sup>Hh+</sup> could also regulate Hh signalling pathway in a manner mirroring lipoproteins-derived Smo-inhibitory lipids. Indeed, *Drosophila* studies reveal that Ptch destabilizes Smo at the membrane using lipids, recently identified as endocannabinoids [54], derived from internalized lipoprotein particles [55]. The presence of Hh on lipoproteins would inhibit utilization of their lipids by Ptch, blocking the repressive function of lipoproteins-associated forms of Hh [55].

By using antagonists that bind at different sites of Smo, we showed that, unlike SAG or recShh, MP<sup>Hh+</sup> inhibitory effects were not reversed by most of Smo site 1-binding antagonists (cyclopamine or GDC-0449), nor site 2-binding antagonist (SANT-1) or combined site-1/site-2 antagonist (MRT-92). Similar antagonism profile was observed when Hh pathway was activated by GSA-10. Of interest, the anti-adipogenic effects of both MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 were completely antagonized by LDE225, which was proposed to bind at the level of site 1 [41]. Such results suggest that MP-associated Hh may correspond to the natural ligand that activates a Smo form identical to the one activated by GSA-10, but not by recShh or SAG. We previously showed that two activators of adenylate cyclase, forskolin and cholera toxin, potentiate GSA-10 differentiation effects on C3H10T1/2 cells [15]. In 3T3-L1 cells, we observed that GSA-10, like MP<sup>Hh+</sup>, retained its inhibitory effects even in the presence of IBMX, a phosphodiesterase inhibitor that maintains high intracellular levels of cAMP. One could therefore question the ability of cAMP to stabilize or potentiate such a Smo conformation. Finally, most of the antagonists tested in this study, like MRT-92, inhibit Smo trafficking in the cilium [40], whereas they



do not antagonize MP<sup>Hh+</sup> anti-adipogenic effects. This suggests that MP<sup>Hh+</sup> would activate a Smo conformation, which would mediate Hh downstream pathways independently of cilium translocation in agreement with the behaviour of a Smo conformation sensitive to GSA-10 identified in C3H10T1/2 cells [15].

Our results provide evidence that natural Hh ligand carried by MP can activate a Smo/Lkb1/Ampk axis, disconnected from the canonical Hh signalling pathway, which will play a central role in metabolic responses. Lkb1 and Ampk proteins were shown to be concentrated at the basal-body of the cilium in kidney epithelial cells [56] and identified as a complex with acetylated  $\alpha$ -tubulin in co-immunoprecipitation experiments in 3T3-L1 mature adipocytes [14]. However, MP<sup>Hh+</sup>-induced Smo/Lkb1/Ampk axis displays some substantive differences with the pathway previously described in mature adipocytes [14]. First, SAG or recShh do not induce Ampk phosphorylation in preadipocytes and their anti-adipogenic effects are also not reversed by Lkb1 silencing. This is illustrated by the continuous decrease of PPAR $\gamma$  and aP2 mRNA expression in Lkb1 KD 3T3-L1 cells. Second, MP<sup>Hh+</sup> or GSA-10 effects are independent of calcium flux modulation since silencing of Camkk2 in 3T3-L1 does not prevent their inhibitory effects. Third, we did not observe any change in acidification of culture media or in lactate concentrations following 24 h treatment with Hh signalling inducers on preadipocytes (A.F., S.L.L. unpublished data). These differential responses between preadipocytes and adipocytes might be related to the regulation of distinct metabolic pathways between the two stages of maturation and to the presence of distinct Smo conformations. Moreover, absence of the cilium in mature adipocytes may condition Hh signalling responses in favour of a non-canonical pathway not linked to this primary organelle. Recent work demonstrates that activation of Ampk reduces Gli1 protein stability and transcription activity in medulloblastoma, therefore compromising Hh canonical responses [57]. Lkb1/Ampk signalling was recently shown to inhibit adipocyte differentiation through its negative action on CREB-regulated transcription co-activators (CRTC) and on Class IIa histone deacetylases, both being important regulators of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  expression [46]. Furthermore, Ampk activation may also contribute to inhibit adipogenesis by modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin

pathway [48]. Our data showed that MP<sup>Hh+</sup>-related anti-adipogenic effects are upstream of PPAR $\gamma$  therefore such mechanisms of adipogenesis inhibition are plausible.

The release of extracellular vesicles-associated Hh in *Drosophila* [17, 23, 58] or in different mammalian cell types [21, 22, 24] raises the question of their pathophysiological relevance *in vivo*. Circulating MP from healthy patients harbour Hh proteins [22] however, to date, no report has studied the proportion of circulating Hh transported in association with extracellular vesicles. Yet, MP<sup>Hh+</sup> release can be stimulated following specific signals suggesting their potential involvement in pathophysiological responses. We previously reported that systemic injection of MP<sup>Hh+</sup> corrects angiotensin-II-induced hypertension and endothelial dysfunction in mice [59], and exerts cardioprotection against ischemia reperfusion injuries in pigs [30]. Our current study identifies anti-adipogenic properties of MP<sup>Hh+</sup>. Considering the ability of Hh signalling to modulate fat metabolism through regulation of fat storage [33, 34], glucose uptake [14] or mobilization of fat body lipids in *Drosophila* [60], this raises the question of the ability of circulating MP<sup>Hh+</sup> to control adipose tissue development *in vivo*. In addition, Smo-dependent non-canonical Hh signalling was reported to elicit various cellular responses ranging from Ca<sup>2+</sup> signalling and cytoskeletal rearrangements to metabolic rewiring pathways [61]. The contribution of these non-canonical Hh signalling axes in comparison to Hh canonical pathways, in overall metabolism is still an open question. In this context, MP<sup>Hh+</sup> as natural Hh non-canonical pathway inducers represent interesting biological tools to investigate the complexity of Hh responses events either linked to canonical or non-canonical Hh signalling.

In conclusion, despite complete adipogenesis blockade following recShh/SAG or MP<sup>Hh+</sup>/GSA-10 treatment of 3T3-L1 preadipocytes, molecular mechanisms behind these inhibitory effects are different and use canonical or non-canonical Hh signalling pathways, respectively (Fig.6). This report suggests that MP<sup>Hh+</sup> induce a signalling pathway involving Smo receptor in preadipocytes, which is independent of the increased transcription of Gli factors, and shares many pharmacological features with the Smo conformation activated by GSA-10, thus illustrating non-canonical Hh responses. This work therefore

highlights novel therapeutic strategies based on  $MP^{Hh+}$  or GSA-10 agonist to modulate adipose tissue development and more largely the non-canonical Hh pathways at the whole organism level.

## Materials and Methods

### *Reagents and compounds*

Unless otherwise stated, all chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). SAG, GSA-10, GDC-0449, MRT-92 and LDE225 were synthesized as described [15, 22, 40]. Purmorphamine and recombinant Shh (C25II N-Term, RecShh) was purchased from Calbiochem and R&D Systems, respectively. Cyclopamine was purchased from Enzo Life Sciences and KAAD-Cyclopamine was from Santa Cruz Biotechnologies. SANT-1 was obtained from TOCRIS. SAG and cyclopamine were dissolved in ethanol, while the other compounds were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mM, except GSA-10, which was at 2.5 mM. Unless specified, the following concentrations of these compounds were used: SAG (200 nM), GSA-10 (10  $\mu$ M), recShh (0.5  $\mu$ g/mL), KAAD-cyclopamine and cyclopamine (10  $\mu$ M), SANT-1 (1  $\mu$ M), LDE225 (3  $\mu$ M), MRT-92 (1  $\mu$ M) and GDC-0449 (3  $\mu$ M).

### *Cell culture*

3T3-L1 cells were maintained in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% donor calf serum at 37°C and 10% CO<sub>2</sub>. They were induced to differentiate two-days post-confluence in classical medium in the presence of 10% foetal bovine serum (FBS), 250  $\mu$ M 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1.25  $\mu$ M dexamethasone (Dex) and 250 nM insulin for three days, and then cultured with 100 nM insulin alone until complete adipocyte differentiation (day 6-8). In minimal induction medium conditions, two-day old post-confluent cells were treated with 5  $\mu$ M rosiglitazone and 870 nM insulin for three days followed by incubation with 100 nM insulin alone until complete differentiation. Cells were treated with MP or compounds as indicated in the figure legends.

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were isolated from washed filters used during bone marrow graft processing. Experimental procedures using human bone marrow cells were approved by Saint Louis Hospital Ethical Committees for human research (Paris, France). hMSCs were obtained and cultured as previously described [62]. Briefly, bone marrow cells from healthy donors obtained after

Ficoll purification (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) were cultured in  $\alpha$ -minimum essential medium, supplemented with 10% FBS (Gibco, Invitrogen Corporation), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen Corporation) and 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (PeproTech, Neuilly sur Seine, France). At confluence, cells were rinsed with low-glucose DMEM and placed in adipogenic medium composed of DMEM 20% FBS with 1  $\mu$ M dexamethasone, 500  $\mu$ M IBMX, 870 nM insulin and 60  $\mu$ M indomethacin. Based on the maximal effects obtained with this concentration on the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells, 10  $\mu$ g/mL of CEM T-derived MP were incubated with hMSCs during the entire differentiation process. After two weeks, the protein expression of key transcription factors for adipogenesis was evaluated by Western blot analysis. The human lymphoid CEM T cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA) was used for MP production. Cells were seeded at  $10^6$  cells/mL and cultured in serum-free X-VIVO 15 medium (Lonza, Walkersville, MD).

#### *Small-hairpin RNA (ShRNA)*

Ready-to-use lentiviral particles (MISSION<sup>®</sup> from Sigma, pLKO.1 plasmid backbone) expressing shRNA targeting Smo (TRCN0000026245), Ampk $\alpha$ 1 (TRCN0000024003), Lkb1 (TRCN0000024146) or Camkk2 (TRCN0000276649) were used at a multiplicity of infection of 20 in complex with 8  $\mu$ g/mL polybrene to transduce the growth of 3T3-L1 pre-adipocytes. Non-target lentiviral particles expressing a scramble (Scr) shRNA (MISSION<sup>®</sup> pLKO.1-puro Non-Target shRNA Control Transduction Particles, #SHC016V) were used to generate 3T3-L1 control cell lines. Puromycin (6  $\mu$ g/mL) was used to select stable 3T3-L1 fibroblast clones, which were further allowed to differentiate into adipocytes, as described above. SybrGreen real-time qPCR using primers listed in Table S1 were used to validate the knockdown (Kd) efficiencies in 3 independent experiments. The remaining expression levels of targeted genes (compared to gene expression in Scr 3T3-L1 used as control cells) were as follows:  $20.2 \pm 7.1\%$  for Lkb1 Kd;  $23 \pm 5.5\%$  for Camkk2 Kd and  $18.6 \pm 3\%$  for Smo Kd.

pBabe retroviruses were produced as previously described [63] and stably-infected 3T3-L1 selected as detailed above. 3T3-L1 overexpressing PPAR $\gamma$  were cultured to confluence in DMEM 10% FBS and

insulin (870 nM). At confluence, cells were induced to differentiation with dexamethasone (625 nM) and a PPAR $\gamma$  activator (1.2  $\mu$ M rosiglitazone) in the presence or absence of 10  $\mu$ g/mL MP<sup>Hh+</sup>.

### *MP production*

MP were produced from CEM T cells as previously described [22]. Briefly, cells were either treated with actinomycin D (ActD, 1  $\mu$ g/mL) for 24 h or treated with phytohemagglutinin (PHA, 10  $\mu$ g/mL) for 72 h. The cells were then treated with phorbol-12-myristate-13 acetate (PMA, 40 ng/mL) and ActD (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. These different stimulation protocols led to the production of MP with or without Hh (Fig. 1A). Supernatants were obtained by centrifugation at 750g for 20 min and then at 1,500g for 5 min to remove cells and large debris, respectively. MP pellets were recovered from supernatants by two repetitive centrifugations (45 min at 13,000g), washed in 0.9% NaCl and resuspended in 200  $\mu$ l of 0.9% NaCl solution. Exosome pellets were further isolated from MP-depleted supernatants by a 100,000g centrifugation step for 1 h at 4°C, followed by two wash steps with NaCl (100,000g, 1h 4°C), and resuspended in 0.9% NaCl. For experiments using 5E1 blocking antibody, MP<sup>Hh+</sup> (10  $\mu$ g/mL) was preincubated with 10  $\mu$ g/mL 5E1 blocking antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) for 30 min at 37°C in DMEM 10% FBS medium, before incubating with the cells.

To remove nucleic acids, MP were treated with DNaseI or RNaseA as previously described [28]. The efficiency of nuclease treatment was evaluated by MP-RNA/DNA analyses using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Tech. Inc., Santa Clara, CA) to confirm the absence of residual nucleic acids.

### *Oil Red O staining*

Lipid accumulation was quantified by Oil Red O staining. Briefly, 3T3-L1 cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) and incubated with freshly prepared 0.2  $\mu$ m-filtered Oil Red O solution (one part of water mixed with three parts of 1 g/100 mL Oil Red O solution in isopropanol) for 30 min. Extensive washing with PBS removed the excess stain. Oil Red O was extracted from the stained cells using 100% isopropanol. The staining was quantified by measuring the optical density at an absorbance of 510 nm.

### *Cell viability and proliferation*

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to evaluate the toxicity of CEM T-derived MP on 3T3-L1 cells. After 6 hours incubation with MTT (25 µg/mL), at 37°C in a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere, an MTT detergent solution was added for 12 h at 37°C. The optical density of the solution was measured at 570 nm to evaluate cell viability. Cell proliferation following 72 h MP treatment was estimated by counting 4'-6 diamidino-2-phenyl indole-2HCl (DAPI)-stained nuclei of the fixed 3T3-L1 cells per microscopic field. Five independent microscopic fields were quantified.

### *MP internalization*

MP were stained with PKH26 dye (Sigma Aldrich) following the manufacturer's protocol. Briefly, MP were labelled with 2 µM PKH26 dye in 0.9% NaCl solution for 2 min at room temperature. An equal volume of FBS was added to stop the staining reaction. The MP pellet was recovered by centrifuging at 14,000g for 45 min, washing in 0.9% NaCl, and was finally resuspended in 0.9% NaCl. This labelling procedure was efficient as confirmed by flow cytometry (93.5 ± 3.4% of MP population PKH26<sup>+</sup>, n=4 independent labelling experiments).

Post staining, 10 µg/mL PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> were incubated with 3T3-L1 preadipocytes for the indicated times either at 37°C or 4°C. At the end of the incubation time, MP internalization in 3T3-L1 was evaluated either by flow cytometry on trypsinized 3T3-L1 cells resuspended in 250 µl PBS solution (500 MPL system, Beckman Coulter, Villepinte, France), or by confocal microscopy of PFA fixed and DAPI counterstained cells.

### *Alkaline Phosphatase (ALP) assay*

hMSC cells were incubated in the presence of MP<sup>Hh+</sup> in adipogenic medium for 2 weeks. Naphtol-AS-BI phosphate (Sigma-Aldrich, 1.25 mM) was dissolved in 0.2M Tris-HCl buffer, pH 8.5 and mixed with 2.5 mM Fast blue BB (Sigma-Aldrich). 4% PFA-fixed-hMSC cells were incubated with this mixture for 2 h at 37°C. Cells were washed three times with PBS and incubated with 0.1 M NaF

(Sigma-Aldrich) for 30 min. Cells were then rinsed thrice with PBS followed by two rapid washes with distilled water. The percentage of cells positive for ALP (blue) staining was quantified in four independent microscopic fields.

### *Immunoblotting*

Protein lysates either from cells, MP or exosomes were prepared using the previously described lysis buffer [63]. The protein concentration was determined using a Quick-Start Bradford Bio-Rad kit and samples were subjected to SDS-PAGE on 4-12 % Bis-acrylamide resolving gels (Novex® NuPAGE® precasted gels, Life Technologies, Saint Aubin, France). 15 µg of cell lysates or 20 µg of MP or exosomal preparations were diluted with 6X Laemmli Buffer before loading on the gel. The separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Pittsburg, PA) and blotted according to standard procedures. Protein signals were visualized using enhanced chemiluminescence (Immunocruz, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) with a Chemi-Smart 5000 imager system (Vilber-Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

The following primary antibodies diluted in TBS/0.1% Tween, 5% BSA were used: β-actin (1:1000; Sigma; #5316), anti-total Ampkα (1:1000; CST; #2532), anti-phospho Ampkα (Thr172) (1:1000; CST; #2535), anti-C/EBPα (1:1000; SC biotech; sc-61), anti-aP2 (1:1000; CST; #2120), anti-PPARγ (1:1000; CST; #2435), anti-Pref-1 (1:1000; CST; #2069), anti-Hh (1:1000 rabbit antiserum [64]), anti-phospho Ser<sup>473</sup> Akt (1:1000; CST, #3827), anti-total Akt (1:1000; CST, #3198), anti-LC3 (1:1000; CST, #4108). For detection of Ampk and LC3 signals, 3T3-L1 cells were starved overnight in high glucose DMEM supplemented with 1% fatty acids free-BSA. The medium was then replaced with fresh starvation medium supplemented with 10 µg/mL MP<sup>Hh+</sup> or the indicated compounds.

Immunoblots were quantified using ImageJ software.

### *Gli-dependent luciferase activity.*

Gli-dependent reporter assay was performed as previously described [40] in Shh-light2 cells stably expressing the Gli-Firefly and renilla reporter [65]. Cells were incubated with the drug to be tested and the luciferase activities were measured 40 h later. The data obtained were the readings of the firefly luciferase activity compared to the Renilla control activity.



### *RNA extraction and real-time qPCR*

3T3-L1 cells treated with either MP or different compounds during the induction cocktail phase were processed at day 6 for RNA extraction using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Total RNA (500 ng) was reverse transcribed using random hexamers and oligodT using PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara/Clontech, Mountain View, CA). SybrGreen primers for the tested genes are listed in Supplemental Table 1 (Table S1). Real-time qPCR was conducted, using 40 ng cDNA and both the forward and the reverse oligonucleotides, in a 20 µl final volume using the iQSybrGreen Supermix (BioRad). Amplification curves were monitored and assessed in a CFX96 thermocycler (Biorad). All values were normalized to 36B4 expression.

### *Confocal microscopy*

3T3-L1 preadipocytes were seeded on coverslips and incubated with MP or chemical compounds for the indicated time and concentrations. Cells were then fixed with 4% PFA in PBS for 20 min, washed, permeabilized with 0.05% Triton X-100 PBS solution for 5 min, and washed in a blocking gelatin-PBS (0.2%) solution. For cilium staining, anti-acetylated tubulin (1:1000; Sigma, #T7451) diluted in the blocking solution supplemented with 1% BSA was incubated on cells for 2 h at room temperature. Cy3-coupled secondary antibody was added (1:1000) in fresh blocking solution for 90 min at room temperature following gelatin-PBS washes. Cells were washed again in gelatin-PBS solution, stained with DAPI, mounted in Mowiol and visualized by confocal laser fluorescence (Zeiss LSM 710).

Acetylated-tubulin (red) positive cells were analysed in five representative microscopic fields at the 20X objective and compared to total cells (DAPI staining). The percentage of ciliated cells was evaluated during the course of 3T3-L1 differentiation or following MP or compound treatments.

### *Statistical analysis*

Data sets were compared for statistical significance using a two-tailed Student's t-test, and data are expressed as Mean ± SEM unless otherwise specified. *p* value <0.05 was considered significant.

## **Acknowledgments**

We thank J. Pairault for providing 3T3-L1 cells; M. Moldes and S. Farmer for providing retroviral pBabe vector expressing shRNA against PPAR $\gamma$ ; G. Mabillean for assistance with Alkaline Phosphatase staining; P. Mallegol for RNA extraction; and G. Hilaiet and N. Benabbou for help with EV preparation and Angele Schoenfelder for reagents synthesis.

SLL is funded by a grant from ANR, MilkChEST n°ANR-12-BSV6-0013-04 and by a grant from “Région Pays de la Loire”. AF received a PhD fellowship from “Région Pays de la Loire”. MR is supported by a grant from Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and by La Ligue Contre le Cancer. LH is the recipient of a doctoral fellowship from La Ligue contre le Cancer and la Fondation Recherche Médicale (FDT20140930825).

## **Author contributions**

SLL, AF, and LH conceived, designed experiments, researched data, and wrote the manuscript. HF, JL, CJ researched data, reviewed and edited the manuscript. MCM, MR and RA designed experiments, reviewed and edited the manuscript. MT, EP, AM, MR and NG contributed to reagents.

SLL and AF are guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## **Conflict of interest**

Authors declare no conflict of interest.

## References

1. Varjosalo M, Taipale J (2008) Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & development* **22**: 2454-72
2. Petrova R, Joyner AL (2014) Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development* **141**: 3445-57
3. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV, *et al.* (1996) Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* **86**: 21-34
4. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, *et al.* (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *The Journal of biological chemistry* **273**: 14037-45
5. Gallet A (2011) Hedgehog morphogen: from secretion to reception. *Trends in cell biology* **21**: 238-46
6. Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, Krauss RS, McMahon AP (2011) Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Developmental cell* **20**: 775-87
7. Ruat M, Hoch L, Faure H, Rognan D (2014) Targeting of Smoothed for therapeutic gain. *Trends in pharmacological sciences* **35**: 237-46
8. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**: 372-6
9. Belgacem YH, Borodinsky LN (2011) Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4482-7
10. Riobo NA (2015) *Hedgehog signaling protocols*. Humana Press,
11. Chinchilla P, Xiao L, Kazanietz MG, Riobo NA (2010) Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* **9**: 570-79
12. Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR, Riobo NA (2011) Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *The Journal of biological chemistry* **286**: 19589-96
13. Yam PT, Langlois SD, Morin S, Charron F (2009) Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* **62**: 349-62
14. Teperino R, Amann S, Bayer M, McGee SL, Loipetzberger A, Connor T, Jaeger C, Kammerer B, Winter L, Wiche G, *et al.* (2012) Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell* **151**: 414-26
15. Gorojankina T, Hoch L, Faure H, Roudaut H, Traiffort E, Schoenfelder A, Girard N, Mann A, Manetti F, Solinas A, *et al.* (2013) Discovery, molecular and pharmacological characterization of GSA-10, a novel small-molecule positive modulator of Smoothed. *Molecular pharmacology* **83**: 1020-9
16. Feng J, White B, Tyurina OV, Guner B, Larson T, Lee HY, Karlstrom RO, Kohtz JD (2004) Synergistic and antagonistic roles of the Sonic hedgehog N- and C-terminal lipids. *Development* **131**: 4357-70
17. Matusek T, Wendler F, Poles S, Pizette S, D'Angelo G, Furthauer M, Therond PP (2014) The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature* **516**: 99-103
18. Zeng X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ, Jr., Schreiner CM, Robbins DJ (2001) A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* **411**: 716-20
19. Panakova D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S (2005) Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* **435**: 58-65
20. Palm W, Swierczynska MM, Kumari V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Eaton S (2013) Secretion and signaling activities of lipoprotein-associated hedgehog and non-sterol-modified hedgehog in flies and mammals. *PLoS biology* **11**: e1001505
21. Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N (2005) FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* **435**: 172-7

22. Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, Freyssinet JM (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* **108**: 3012-20
23. Liegeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M (2006) The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* **173**: 949-61
24. Witek RP, Yang L, Liu R, Jung Y, Omenetti A, Syn WK, Choi SS, Cheong Y, Fearing CM, Agboola KM, *et al.* (2009) Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology* **136**: 320-330 e2
25. Vyas N, Walvekar A, Tate D, Lakshmanan V, Bansal D, Lo Cicero A, Raposo G, Palakodeti D, Dhawan J (2014) Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties. *Scientific reports* **4**: 7357
26. Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martinez MC (2009) Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* **30**: 580-8
27. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC, Andriantsitohaina R (2007) Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**: 2735-41
28. Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Carmen Martinez M (2012) Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free radical biology & medicine* **53**: 2159-70
29. Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martinez MC (2010) Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PloS one* **5**: e12688
30. Paulis L, Fauconnier J, Cazorla O, Thireau J, Soleti R, Vidal B, Ouille A, Bartholome M, Bideaux P, Roubille F, *et al.* (2015) Activation of Sonic hedgehog signaling in ventricular cardiomyocytes exerts cardioprotection against ischemia reperfusion injuries. *Scientific reports* **5**: 7983
31. Fleury A, Martinez MC, Le Lay S (2014) Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Frontiers in immunology* **5**: 370
32. Briscoe J, Therond PP (2013) The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 416-29
33. Suh JM, Gao X, McKay J, McKay R, Salo Z, Graff JM (2006) Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation. *Cell metabolism* **3**: 25-34
34. Pospisilik JA, Schramek D, Schnidar H, Cronin SJ, Nehme NT, Zhang X, Knauf C, Cani PD, Aumayr K, Todoric J, *et al.* (2010) Drosophila genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate. *Cell* **140**: 148-60
35. Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, Courtois B, Bergaud B, Ramez V, Blanchet AM, *et al.* (2001) Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *Journal of cell science* **114**: 2085-94
36. Forcioli-Conti N, Lacas-Gervais S, Dani C, Peraldi P (2015) The primary cilium undergoes dynamic size modifications during adipocyte differentiation of human adipose stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* **458**: 117-22
37. Marion V, Stoetzel C, Schlicht D, Messaddeq N, Koch M, Flori E, Danse JM, Mandel JL, Dollfus H (2009) Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 1820-5
38. Maun HR, Wen X, Lingel A, de Sauvage FJ, Lazarus RA, Scales SJ, Hymowitz SG (2010) Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *The Journal of biological chemistry* **285**: 26570-80
39. Hadden MK (2013) Hedgehog pathway inhibitors: a patent review (2009--present). *Expert opinion on therapeutic patents* **23**: 345-61
40. Hoch L, Faure H, Roudaut H, Schoenfelder A, Mann A, Girard N, Bihannic L, Ayrault O, Petricci E, Taddei M, *et al.* (2015) MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping

- binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**: 1817-29
41. Wang C, Wu H, Evron T, Vardy E, Han GW, Huang XP, Hufeisen SJ, Mangano TJ, Urban DJ, Katritch V, *et al.* (2014) Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs. *Nature communications* **5**: 4355
  42. Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S, Jin S (2009) Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**: 1118-30
  43. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S (2009) Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 19860-5
  44. Pampliega O, Orhon I, Patel B, Sridhar S, Diaz-Carretero A, Beau I, Codogno P, Satir BH, Satir P, Cuervo AM (2013) Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* **502**: 194-200
  45. Jimenez-Sanchez M, Menzies FM, Chang YY, Simecek N, Neufeld TP, Rubinsztein DC (2012) The Hedgehog signalling pathway regulates autophagy. *Nature communications* **3**: 1200
  46. Gormand A, Berggreen C, Amar L, Henriksson E, Lund I, Albinsson S, Goransson O (2014) LKB1 signalling attenuates early events of adipogenesis and responds to adipogenic cues. *Journal of molecular endocrinology* **53**: 117-30
  47. Habinowski SA, Witters LA (2001) The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **286**: 852-6
  48. Lee H, Kang R, Bae S, Yoon Y (2011) AICAR, an activator of AMPK, inhibits adipogenesis via the WNT/beta-catenin pathway in 3T3-L1 adipocytes. *International journal of molecular medicine* **28**: 65-71
  49. Mackie AR, Klyachko E, Thorne T, Schultz KM, Millay M, Ito A, Kamide CE, Liu T, Gupta R, Sahoo S, *et al.* (2012) Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction. *Circulation research* **111**: 312-21
  50. Grover VK, Valadez JG, Bowman AB, Cooper MK (2011) Lipid modifications of Sonic hedgehog ligand dictate cellular reception and signal response. *PloS one* **6**: e21353
  51. Long J, Tokhunts R, Old WM, Houel S, Rodriguez-Blanco J, Singh S, Schilling N, Capobianco AJ, Ahn NG, Robbins DJ (2015) Identification of a family of fatty-acid-speciated sonic hedgehog proteins, whose members display differential biological properties. *Cell reports* **10**: 1280-7
  52. Burger D, Montezano AC, Nishigaki N, He Y, Carter A, Touyz RM (2011) Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**: 1898-907
  53. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA (2005) Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**: 1604-11
  54. Khaliullina H, Bilgin M, Sampaio JL, Shevchenko A, Eaton S (2015) Endocannabinoids are conserved inhibitors of the Hedgehog pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 3415-20
  55. Khaliullina H, Panakova D, Eugster C, Riedel F, Carvalho M, Eaton S (2009) Patched regulates Smoothed trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development* **136**: 4111-21
  56. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, Braeg S, Voelker H, Brecht S, Beyer T, Janusch H, Hamann C, Godel M, *et al.* (2010) Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nature cell biology* **12**: 1115-22
  57. Li YH, Luo J, Mosley YY, Hedrick VE, Paul LN, Chang J, Zhang G, Wang YK, Banko MR, Brunet A, *et al.* (2015) AMP-Activated Protein Kinase Directly Phosphorylates and Destabilizes Hedgehog Pathway Transcription Factor GLI1 in Medulloblastoma. *Cell reports* **12**: 599-609
  58. Gradilla AC, Gonzalez E, Seijo I, Andres G, Bischoff M, Gonzalez-Mendez L, Sanchez V, Callejo A, Ibanez C, Guerra M, *et al.* (2014) Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nature communications* **5**: 5649
  59. Marrachelli VG, Mastronardi ML, Sarr M, Soleti R, Leonetti D, Martinez MC, Andriantsitohaina R (2013) Sonic hedgehog carried by microparticles corrects angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in mice. *PloS one* **8**: e72861

60. Rodenfels J, Lavrynenko O, Aycirix S, Sampaio JL, Carvalho M, Shevchenko A, Eaton S (2014) Production of systemically circulating Hedgehog by the intestine couples nutrition to growth and development. *Genes & development* **28**: 2636-51
61. Teperino R, Aberger F, Esterbauer H, Riobo N, Pospisilik JA (2014) Canonical and non-canonical Hedgehog signalling and the control of metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*
62. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, *et al.* (2007) Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* **21**: 158-63
63. Briand N, Prado C, Mabilieu G, Lasnier F, Le Liepvre X, Covington JD, Ravussin E, Le Lay S, Dugail I (2014) Caveolin-1 expression and cavin stability regulate caveolae dynamics in adipocyte lipid store fluctuation. *Diabetes* **63**: 4032-44
64. Traiffort E, Moya KL, Faure H, Hassig R, Ruat M (2001) High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *The European journal of neuroscience* **14**: 839-50
65. Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA (2002) Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 14071-6

## Figures legends

### **Figure 1.** *MP<sup>Hh+</sup> stimulate proliferation and inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation*

A) Immunoblot showing specific association of Hh with MP isolated from supernatants of PMA/PHA/ActD-stimulated CEM-T lymphocytes (MP<sup>Hh+</sup>) compared to ActD-stimulated CEM-T cells (MP<sup>Hh-</sup>).  $\beta$ -actin, known to associate with MP, is used as a loading control. Ponceau red staining of the membrane shows equal protein loading for the two MP preparations.

B) MP<sup>Hh+</sup> or MP<sup>Hh-</sup> do not alter cell viability. Cell viability, estimated using the MTT test, was measured after incubation of 10  $\mu$ g/mL of each MP subtype for 48h on 3T3-L1 preadipocytes.

C) MP<sup>Hh+</sup> significantly increase cell proliferation. 3T3-L1 DAPI-stained nuclei were counted after incubation of 10  $\mu$ g/mL of each MP subtype for 72h on 3T3-L1 preadipocytes.

D) MP<sup>Hh+</sup> inhibit adipocyte differentiation. 3T3-L1 cells were exposed to 10  $\mu$ g/mL of each MP subtype during the all course of differentiation. While the control and MP<sup>Hh-</sup>-treated 3T3-L1 fully differentiate, MP<sup>Hh+</sup>-exposed cells show hardly no differentiated cells as indicated by the absence of ORO-stained cells.

E) Single exposure to MP<sup>Hh+</sup> is sufficient to inhibit adipogenesis. 3T3-L1 cells were exposed to 10  $\mu$ g/mL MP<sup>Hh+</sup> once (on day 0 for 72h, d0-d3) or during the all course of differentiation (d0-d8). ORO quantification (on day 8), scored by measuring OD at 510nm, reveals significant adipogenesis inhibition ( $p < 0.05$ ) following MP<sup>Hh+</sup> treatment, independently of the duration of MP<sup>Hh+</sup> exposure to 3T3-L1.

F) Nuclease-pretreatment of MP<sup>Hh+</sup> does not alter their anti-adipogenic effects. 3T3-L1 were exposed to 10  $\mu$ g/mL MP<sup>Hh+</sup> pre-treated or not with nucleases (RNase or DNase) for 72h. ORO quantification (on day 6) was performed and compared to 3T3-L1 cells not treated with MP (Ctrl).

G-H) MP<sup>Hh+</sup> treatment of 3T3-L1 preadipocytes significantly decreases key adipogenic factors and increases anti-adipogenic markers. mRNA expression (g) and protein expression (h) of key factors of adipocyte differentiation were evaluated on day 6 in the absence or presence of 10 $\mu$ g/mL of indicated MP. Different isoforms of Pref-1 are detected.

I) Stable retroviral expression of PPAR $\gamma$  reverses MP<sup>Hh+</sup>-dependent inhibition of 3T3-L1 adipogenesis. Representative images of ORO-stained cells are shown,  $n=2$  independent experiments. Unless specified, results presented are Mean  $\pm$  SEM from  $n=3-6$  independent experiments, compared to vehicle-treated cells,  $*p<0.05$ . Scale bar: 50  $\mu$ m.

**Figure 2.** *MP<sup>Hh+</sup> induce a pro-osteogenic program in human MSCs*

A) MP<sup>Hh+</sup> inhibit adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs). hMSCs were placed in adipogenic conditions and incubated with 10  $\mu$ g/mL of MP<sup>Hh+</sup> or MP<sup>Hh-</sup>. Represented images of ORO-stained cells are shown,  $n=2$  independent experiments (scale bar: 50  $\mu$ m).

B) MP<sup>Hh+</sup> alter protein expression of key adipocyte factors of hMSCs-differentiated adipocytes.

C-D) MP<sup>Hh+</sup> induce the expression of osteogenic markers in hMSCs. hMSCs were incubated with 10  $\mu$ g/mL MP<sup>Hh+</sup> in adipogenic conditions. mRNA expression of transcription factor Runx2 was assessed by real-time qPCR (C) and alkaline phosphatase activity (ALP) was evaluated following ALP staining assay (D). Representative images of ALP-stained cells are shown (scale bar: 50  $\mu$ m). Results presented are Mean  $\pm$  SEM compared to vehicle-treated cells,  $n=3$ ,  $*p<0.05$ .

**Figure 3.** *Adipogenesis inhibition induced by MP<sup>Hh+</sup> and by the Smo agonist GSA-10 is independent of the Hh canonical pathway*

A) Anti-adipogenic effects of MP<sup>Hh+</sup> or GSA-10 are not dependent on the presence of IBMX or dexamethasone in the induction medium, contrary to that of SAG, purmorphamine or recShh. Oil Red O staining of 3T3-L1 cells (day 6 of differentiation) induced with classical (IBMX/Dex/Ins) or minimal (Rosi/Ins) differentiation cocktails in the absence (Ctrl) or presence of SAG (200 nM), purmorphamine (purmo, 10  $\mu$ M) and recShh (0.5  $\mu$ g/mL), 10  $\mu$ g/mL MP<sup>Hh+</sup> or GSA-10 (10  $\mu$ M). Representative images of ORO-stained cells are shown (scale bar: 50  $\mu$ m). ORO-quantification results presented are Mean  $\pm$  SEM compared to vehicle-treated cells,  $n=3-5$ ,  $*p<0.05$ .

B) Differential effects of MP and Smo agonists SAG and GSA-10 on Gli-dependent luciferase activity. Gli-luciferase reporter activity in Shh-light2 cells was measured in the presence of SAG (1  $\mu$ M), GSA-10 (3  $\mu$ M), MP<sup>Hh+</sup> (10  $\mu$ g/mL) and MP<sup>Hh-</sup> (10  $\mu$ g/mL). Results are expressed as fold change



(FC), compared to cells treated with vehicle alone. SAG but not MP<sup>Hh+</sup>, MP<sup>Hh-</sup> or GSA-10 induces Gli-luciferase activity compared with vehicle. Data are Mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \* $p \leq 0.001$ .

C) mRNA expression levels of Hh pathway genes tested by real-time qPCR in response to MP<sup>Hh+</sup> and Smo agonists SAG and GSA-10 in minimal induction medium. Compound concentrations were similar to those in (A). Fold change of mRNA expression for *Gli1* and *Ptch* are presented relative to cells treated with vehicle alone in minimal induction medium. SAG and recShh induced a strong induction of scored by gene expression of *Gli1* and *Ptch* target genes (10-40 fold increase) whereas MP<sup>Hh+</sup> or GSA-10 display no inductive effect on Gli-transcriptional activity. Results are Mean  $\pm$  SEM,  $n=3-5$ , \* $p < 0.05$ .

D) Smo knockdown abrogates inhibition of differentiation induced by SAG, MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10. 3T3-L1 cells stably expressing scrambled shRNA (Scr) or Smo shRNA (Smo Kd) were treated in minimal induction medium with SAG (200 nM), MP<sup>Hh+</sup> (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or GSA-10 (10  $\mu\text{M}$ ) during the induction period. Oil Red O staining and quantification show reversion of adipocyte differentiation blockade induced by all Hh signalling inducers in Smo Kd 3T3-L1 compared Scr 3T3-L1 cells.

E) 5E1 Ab blocks anti-adipogenic effects of recShh, but not those induced by MP<sup>Hh+</sup>. 3T3-L1 cells were incubated with recShh (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or MP<sup>Hh+</sup> (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), both reagents preincubated with or without 5E1 Ab (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 30 min. Representative images are shown,  $n=2$  independent experiments (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 4.** *LDE225 Smo antagonist reverses adipogenesis blockade in MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10-treated 3T3-L1 cells*

A-B) Effects of Smo antagonists (Cyclopamine, 10 $\mu\text{M}$ ; GDC-0449, 3  $\mu\text{M}$ ; SANT-1, 1 $\mu\text{M}$ ; MRT-92, 1 $\mu\text{M}$ ; LDE225, 3 $\mu\text{M}$ ) added to 3T3-L1 cells concomitantly incubated with SAG, recShh, MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 (at similar concentrations to those used for Fig.3A) in minimal induction conditions were compared to vehicle-treated 3T3-L1 (no antagonist). Representative ORO-stained images of these experiments are presented in (A) and ORO-quantification results (B) presented are Mean  $\pm$  SEM compared to vehicle-treated cells,  $n=3-5$ , \* $p < 0.05$ .

**Figure 5.** *MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10 induce inhibition of adipocyte differentiation through activation of Ampk signalling pathway*

A) Western-blot showing increased phosphorylation of Ampk in MP<sup>Hh+</sup> (10µg/mL) and GSA-10-treated 3T3-L1 preadipocyte cells for 24h. Following compound concentrations were used: SAG (200 nM), GSA-10 (10µM), MP<sup>Hh+</sup> (10 µg/mL) and recShh (0.5 µg/mL). β-actin immunoblot serves as a loading control. Immunoblots quantification was performed from at least  $n = 3$  independent experiments. P-Ampk/total Ampk ratio is presented as Mean ± SEM, \* $p < 0.05$ .

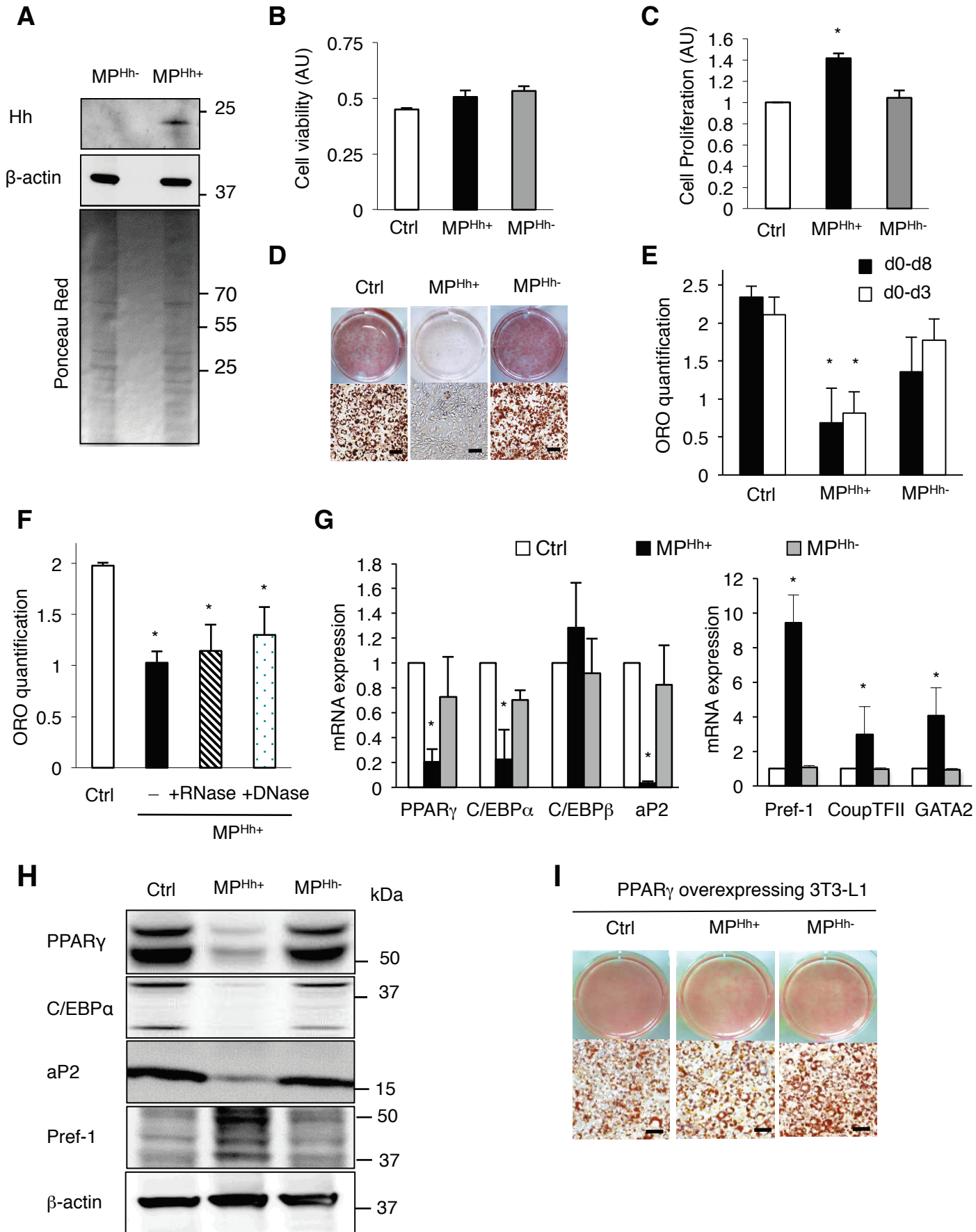
B) Lkb1 silencing prevents from MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10-induced anti-adipogenic effects as illustrated by restored lipid accumulation. 3T3-L1 stably expressing scrambled shRNA (Scr), Camkk2 shRNA (Camkk2 Kd) or Lkb1 shRNA (Lkb1 Kd) and the control cell line were treated with 10 µg/mL MP<sup>Hh+</sup> or 10 µM GSA-10 during the induction cocktail in minimal induction medium. Representative ORO-stained images of 3T3-L1-treated cells (day 6 of differentiation) are presented,  $n=2$  independent experiments.

C-D) Lkb1 knockdown abrogates inhibition of differentiation induced by MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10, whereas Camkk2 knockdown has no effects. Camkk2 Kd or Lkb1 shRNA 3T3-L1 cells were treated or not treated (Ctrl) with 10 µg/mL MP<sup>Hh+</sup> or 10 µM GSA-10 during the induction period. PPAR $\gamma$  and aP2 mRNA expression was analysed by real-time qPCR analysis. Lkb1 Kd abrogates inhibition of differentiation induced by MP<sup>Hh+</sup> or GSA-10 as illustrated by reversed mRNA expression of PPAR $\gamma$  and aP2 (C) whereas inhibition of the mRNA expression of these two genes is still maintained in Camkk2 Kd cells (D). Conversely, neither Lkb1 nor Camkk2 silencing reverse anti-adipogenic effects of SAG (200 nM) or recShh (0.5 µg/µl) illustrated by conserved inhibition of adipocyte markers (C-D). Results are Mean ± SEM,  $n=3-5$ , \* $p < 0.05$ .

**Figure 6.** *Proposed models of Hh signalling pathways used by recShh and SAG or MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10, respectively, to inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells.*

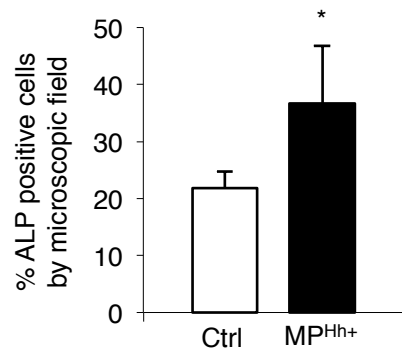
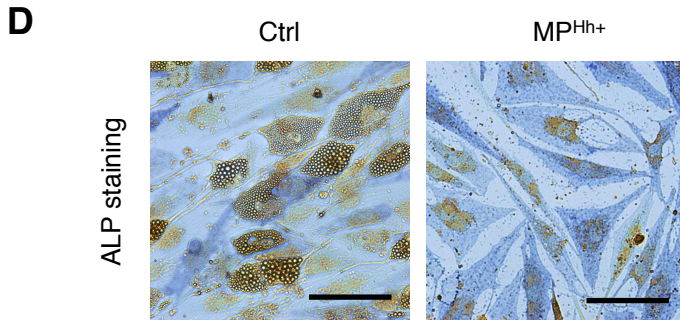
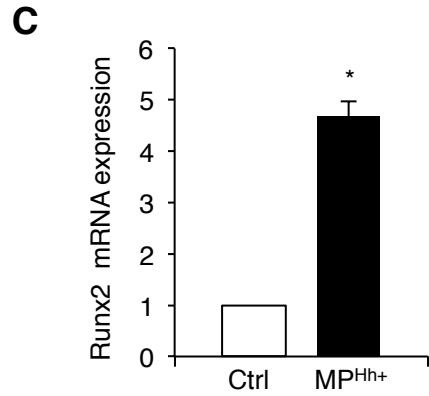
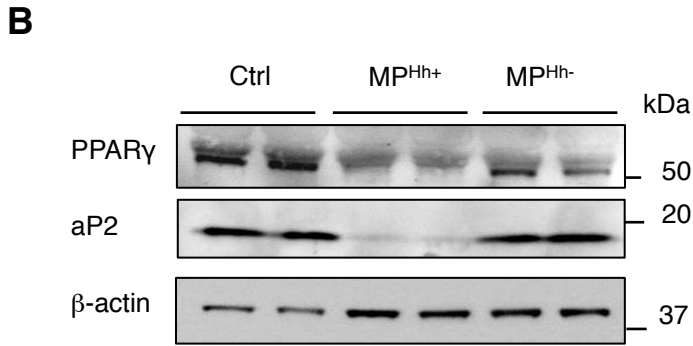
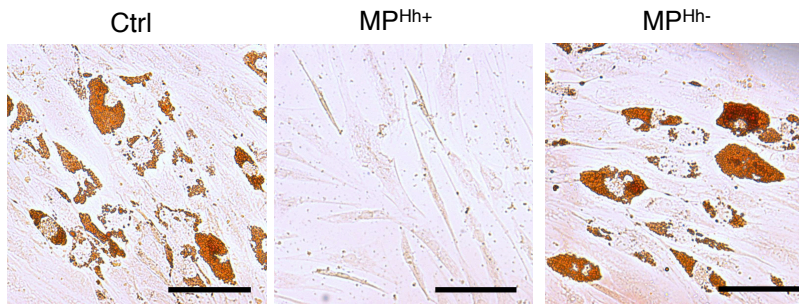
A) Hh canonical pathway induced by recShh and SAG. Non-lipidated form of Hh (recShh) or SAG by binding to Ptch and Smo, respectively, inhibits 3T3-L1 adipogenesis in minimal induction medium through Smo activation leading to Gli factors transactivation, and adipocyte differentiation inhibition.

B) Hh non-canonical pathway induced by  $MP^{Hh+}$  and GSA-10.  $MP^{Hh+}$  (by binding to Ptch ?) trigger a potent inhibition of adipocyte conversion similar to the inhibitory effects of recShh or SAG, but molecular mechanisms differ and involve non-canonical Hh signalling. Smo agonist GSA-10 recapitulates the hallmarks of  $MP^{Hh+}$ -induced anti-adipogenic effects. Despite a Smo-dependency,  $MP^{Hh+}$  and GSA-10 effects are independent of increased transcription of Gli1 factors. Conversely,  $MP^{Hh+}$  and GSA-10 both rely on a Smo/Lkb1/Ampk axis to exert their anti-adipogenic effects, illustrating non-canonical Hh responses.

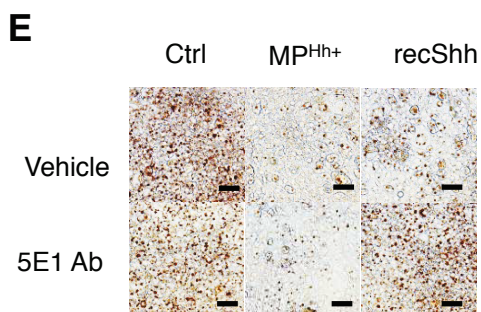
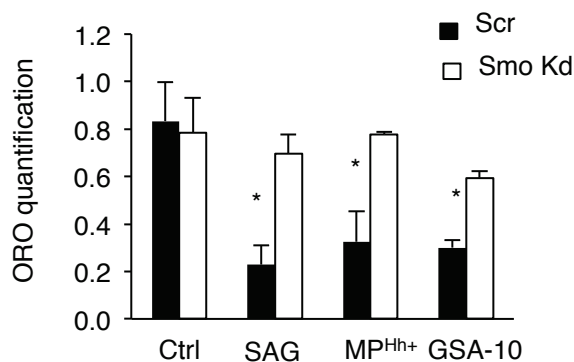
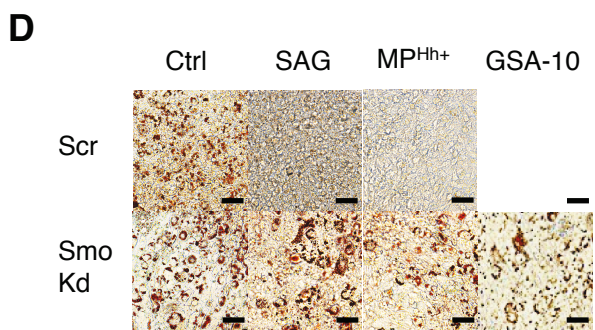
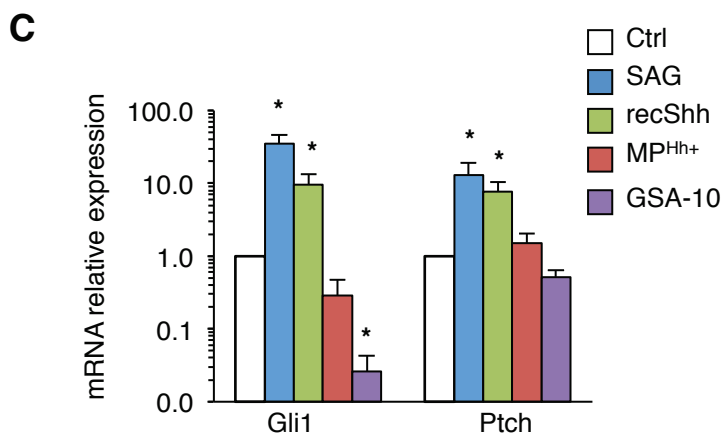
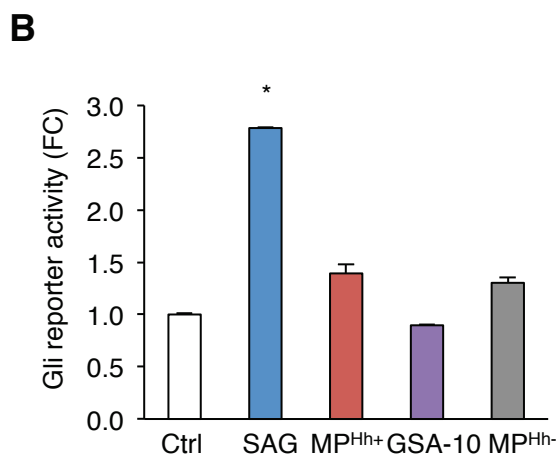
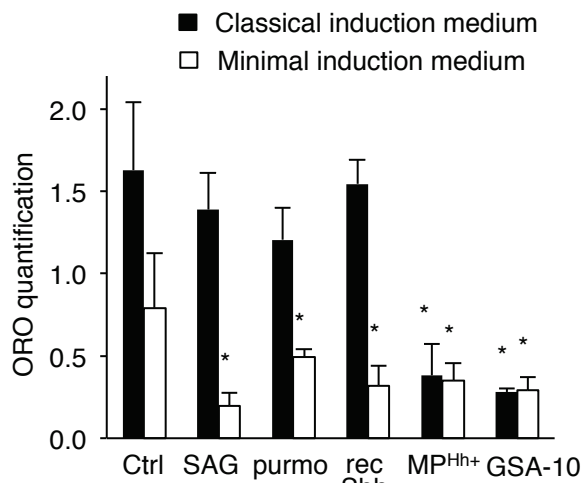
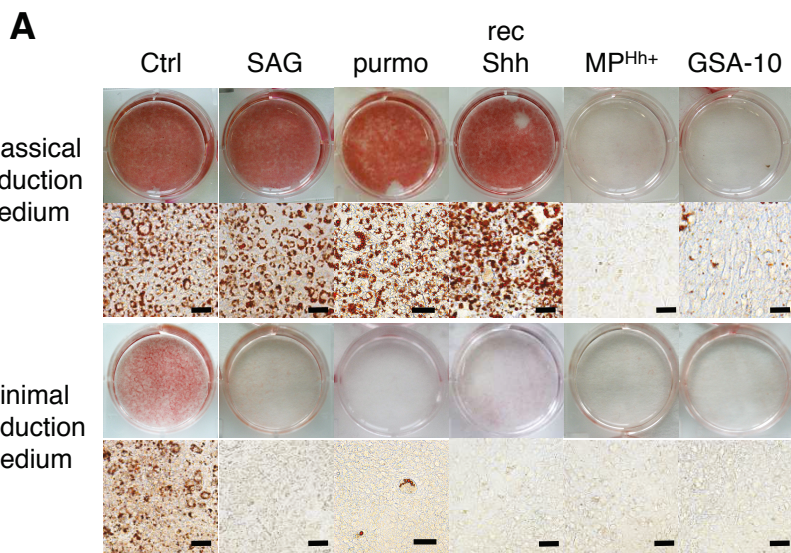


**Figure 1**

**A** hMSCs in adipogenic medium

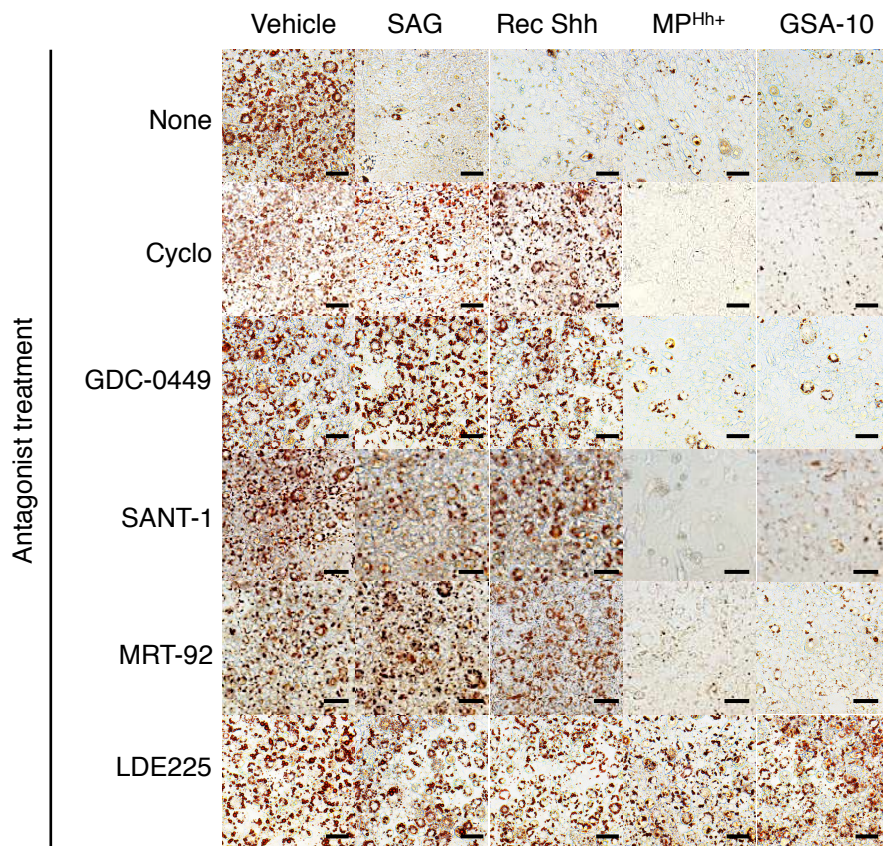
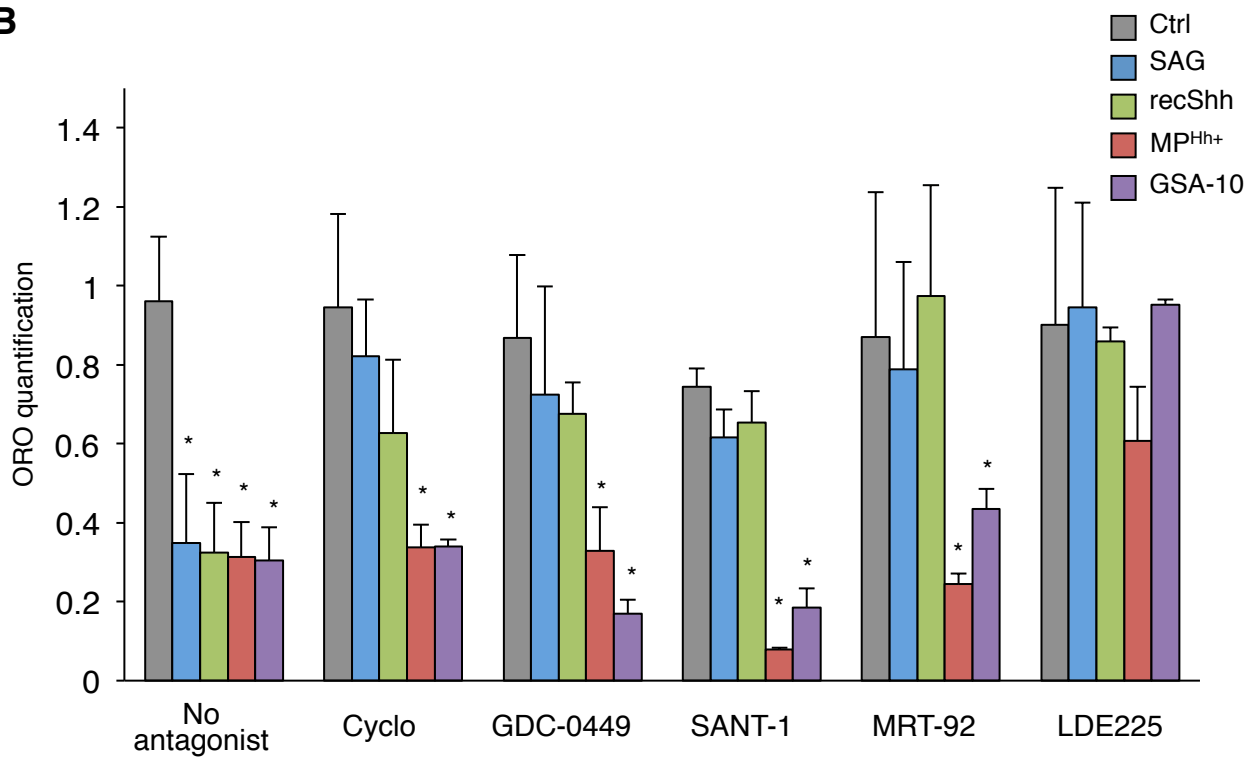


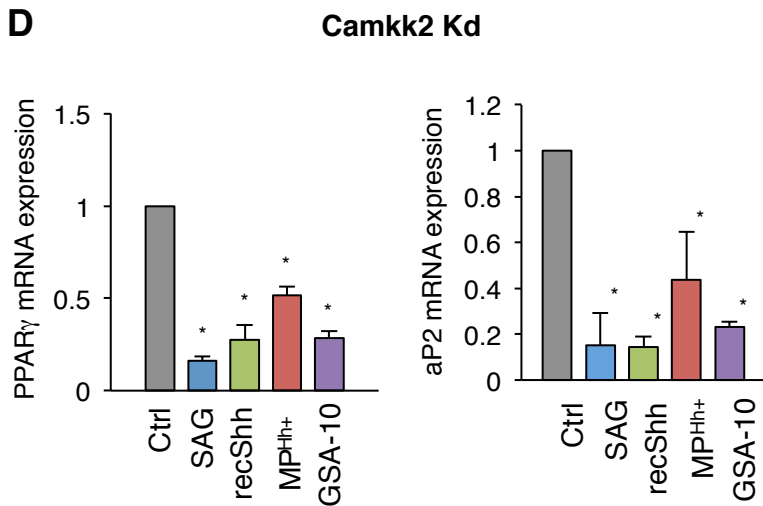
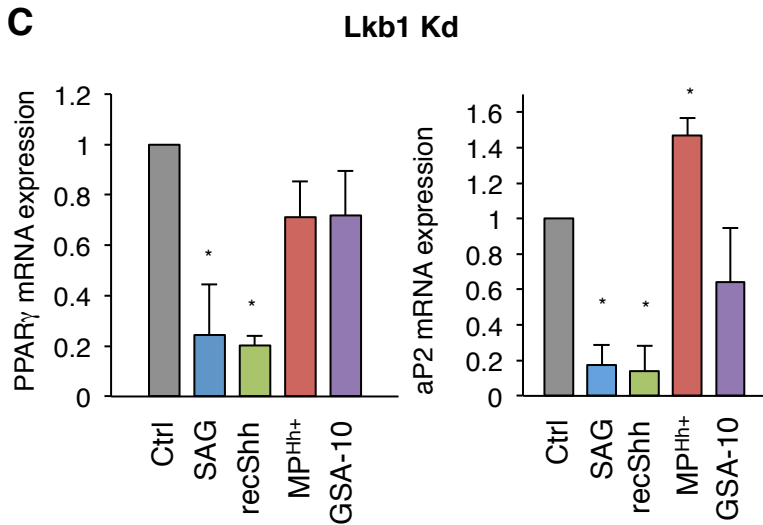
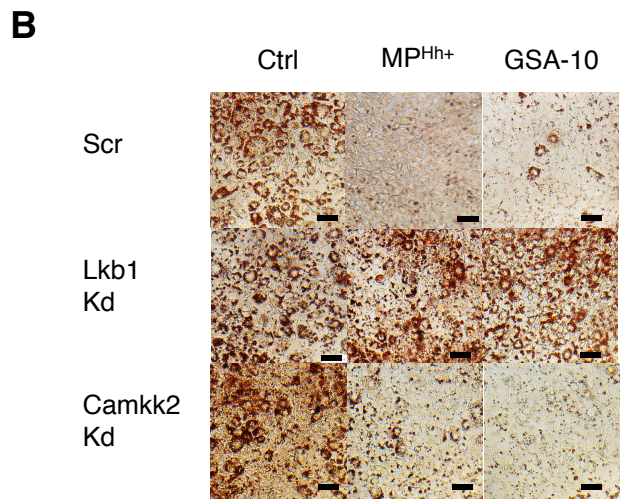
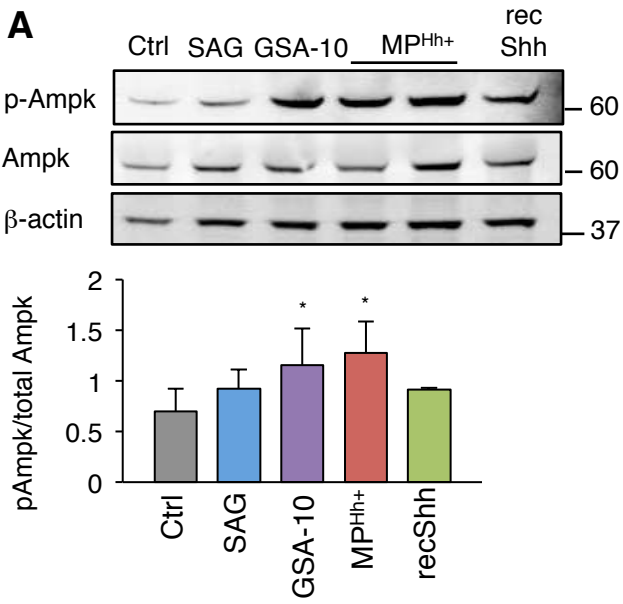
**Figure 2**



**Figure 3**



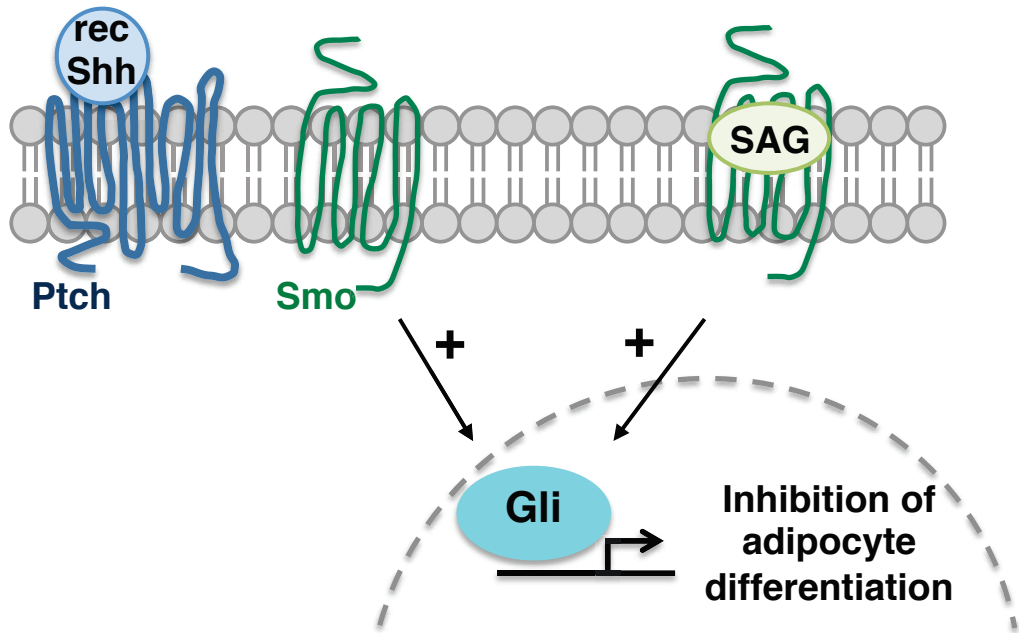
**A****B****Figure 4**



**Figure 5**



a- Hh canonical pathway induced by recShh or SAG



b- Hh non-canonical pathway induced by MP<sup>Hh+</sup> and GSA-10

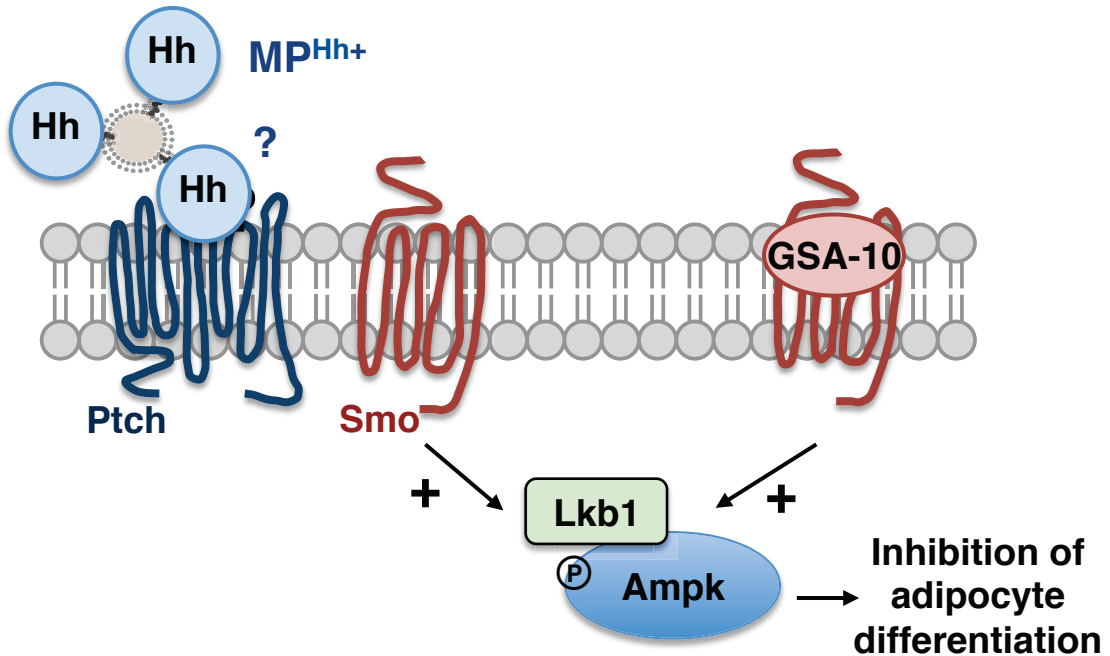
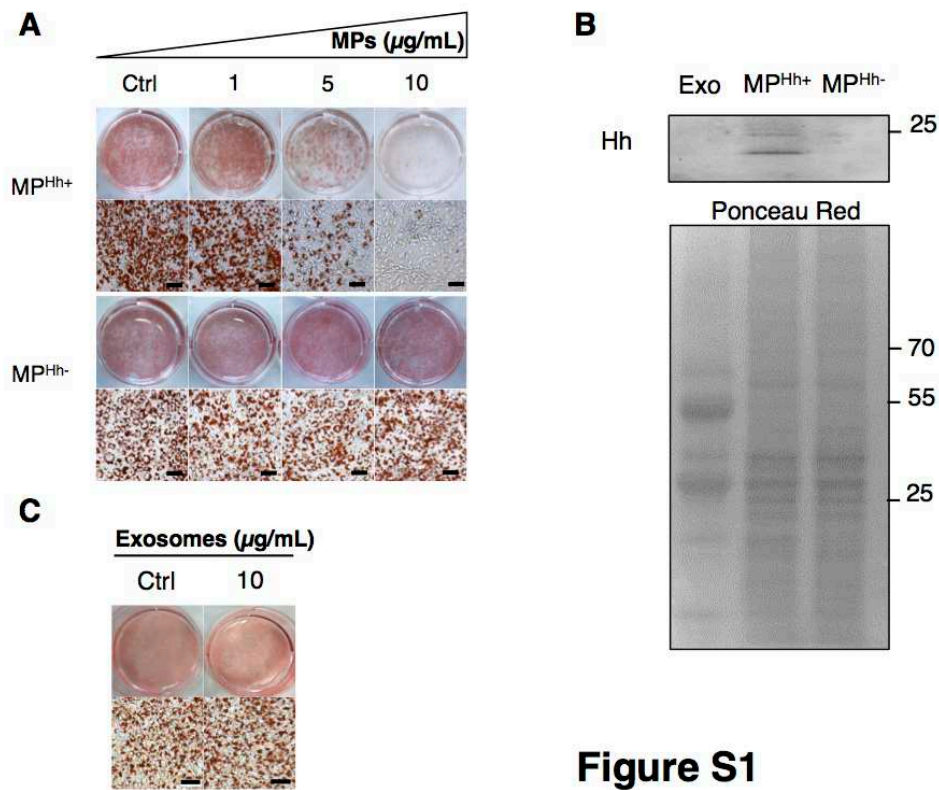


Figure 6

## **Supplementary information**

### **Hedgehog associated to microparticles inhibits adipocyte differentiation *via* a non-canonical pathway**

Audrey Fleury, Lucile Hoch, M. Carmen Martinez, Hélène Faure, Maurizio Taddei, Elena Petricci, Fabrizio Manetti, Nicolas Girard, Andre Mann, Caroline Jacques, Jérôme Larghero, Martial Ruat, Ramaroson Andriantsitohaina and Soazig Le Lay



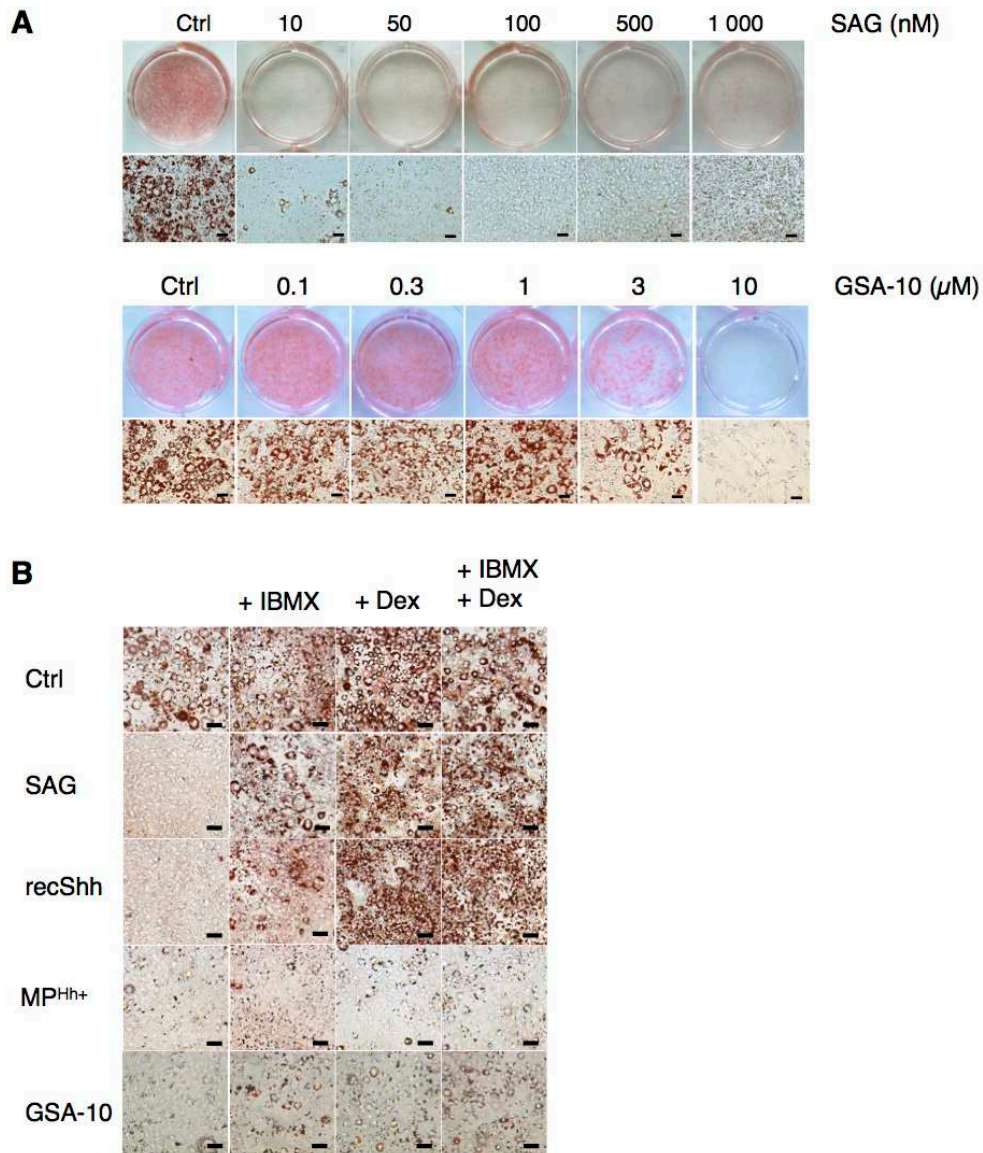
**Figure S1**

**Figure S1.**  $\text{MP}^{\text{Hh}+}$ , and not exosomes, inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 in a dose-dependent manner.

A) 3T3-L1 cells were incubated with indicated concentrations of  $\text{MP}^{\text{Hh}+}$  or  $\text{MP}^{\text{Hh}-}$ , in classical induction medium, with a medium change every 24h. Cells were stained with Oil Red O on day 6-8 of differentiation. Representative ORO-stained images are shown. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

B) Hh morphogen specifically associates with the MP fraction and not with the exosomal fraction secreted by activated/apoptotic CEM T lymphocytes. MP and exosomal fractions were isolated from PMA/PHA/ActD-stimulated CEM T lymphocytes supernatants by using different centrifugations steps, and termed Exo and  $\text{MP}^{\text{Hh}+}$ , respectively.  $\text{MP}^{\text{Hh}-}$  were isolated from ActD-stimulated CEM T cells. Immunoblot shows the unique presence of Hh in  $\text{MP}^{\text{Hh}+}$ . Ponceau red staining of the membrane is presented to illustrate sample loading.

C) Exosomes derived from activated/apoptotic CEM T lymphocytes do not alter adipocyte differentiation, in agreement with the absence of Hh. Lipid accumulation was visualized by Oil Red O staining on day 6-8 of differentiation after exposing 3T3-L1 cells (every 24h) to 10 $\mu\text{g/mL}$  exosomes isolated from MP-depleted PMA/PHA/ActD-stimulated CEM T lymphocytes supernatants, which are devoid of Hh (see panel b). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

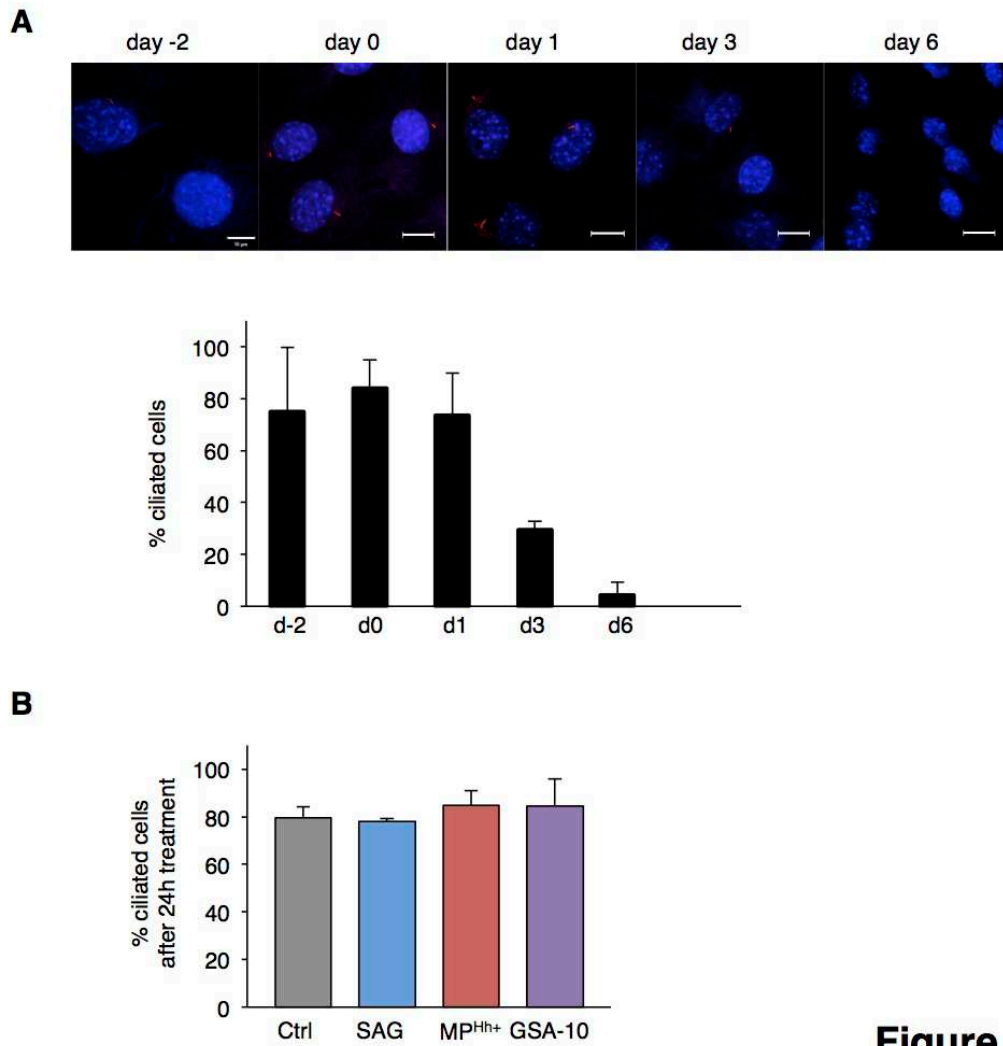


**Figure S2**

**Figure S2.** *Differential inhibition of adipocyte differentiation by Smo agonists, depending on culture medium conditions.*

A) Dose-response of SAG and GSA-10 on 3T3-L1 adipocyte differentiation in minimal induction medium. Indicated concentrations of SAG (upper panel) or GSA-10 (lower panel) were applied to 3T3-L1 preadipocytes for 72h in minimal induction medium, and cells were stained with ORO on day 6 of differentiation. Representative ORO-stained images are shown. Scale bar: 50 $\mu$ m.

B) Addition of Dex or IBMX to minimal induction medium is sufficient to abolish the inhibitory effects of SAG and recShh on adipogenesis as exemplified by ORO staining. Representative ORO images are shown. Scale bar: 50  $\mu$ m.

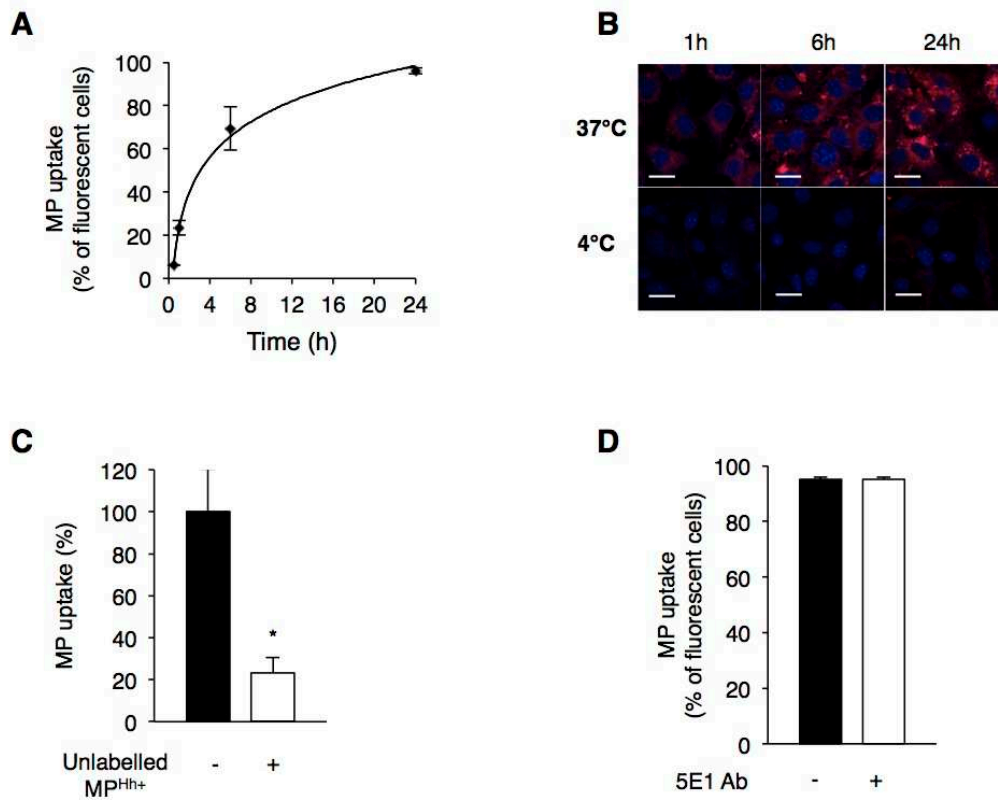


**Figure S3**

**Figure S3.** *MP<sup>Hh+</sup>* do not affect cilium presence in 3T3-L1 cells

A) Representative confocal images during 3T3-L1 differentiation course (from day-2 to day 6) illustrating the transient presence of a primary cilium (anti-acetylated tubulin, red) only in preadipocyte stages. Nuclei of cells are stained with DAPI (blue). Percentage of ciliated cells was calculated based on the ratio of acetylated-tubulin staining to the total cells evaluated by DAPI staining, and expressed as Mean  $\pm$  SEM,  $n=3-5$  independent microscopic fields observed. Note the total absence of cilium in differentiated adipocytes (day 6). Scale bar: 10  $\mu$ m.

B) Treatment of 3T3-L1 cells with Hh signalling activators does not alter cilium presence. Presence of primary cilium per cell after 24h treatment of post-confluent 3T3-L1 (day 0) with SAG (200 nM), MP<sup>Hh+</sup> (10  $\mu$ g/mL) or GSA-10 (10  $\mu$ M) was observed. Data are presented in % of ciliated cells after 24h and are Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  independent microscopic fields observed.



**Figure S4**

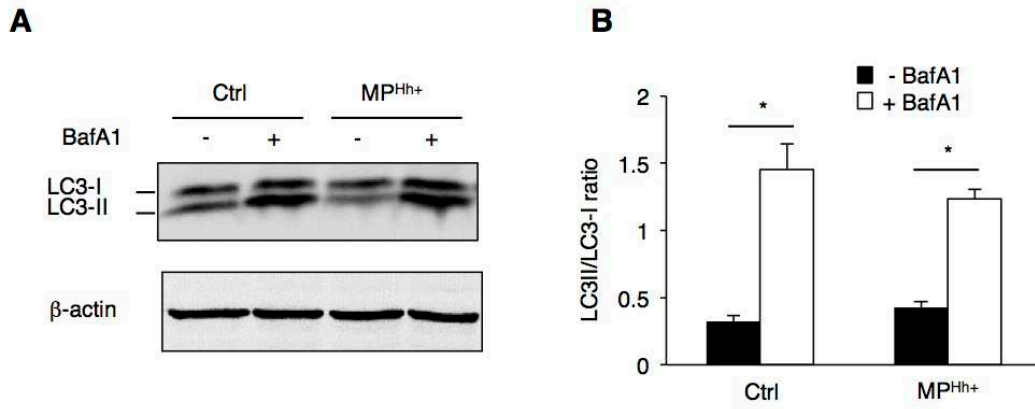
**Figure S4.** *MP<sup>Hh+</sup> internalization is not blocked by preincubation with 5E1 antibody*

A) Time-dependent uptake of PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> investigated by flow cytometry. 3T3-L1 cells incubated with 10 µg/mL PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> were analysed at different time points (1h, 2h, 6h and 24h). Percent of fluorescent 3T3-L1 cells were determined by flow cytometry by detection of PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> uptake in cells.

B) Time-dependent confocal microscopy of PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> uptake at 37°C or 4°C in 3T3-L1 cells. Confocal images of PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> (10 µg/mL) accumulation over time (1h, 6h and 24h) at 37°C. This is totally abolished when cells are placed at 4°C. Representative images are shown, *n*=2 independent experiments (scale bar: 10 µm).

C) PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> uptake in the absence or presence of excess unlabelled MP<sup>Hh+</sup>. Competitive uptake of 10 µg/mL PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> was assessed by adding a five-fold excess of unlabelled MP<sup>Hh+</sup>. Uptake of MP after 1h was quantified by flow cytometry. Fold regulation is relative to cells treated with 10 µg/mL PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> alone.

D) Flow cytometry analysis of PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> uptake preincubated with or without 5E1 antibody. PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> preincubated with or without 10 µg/mL 5E1 Ab for 30min, were incubated for 24h on 3T3-L1 cells. Fold regulation in MP uptake is relative to cells treated with 10 µg/mL PKH26-labeled MP<sup>Hh+</sup> alone. All results are Mean ± SEM, *n*=3, \**p*<0.05.



**Figure S5**

**Figure S5.** *MP<sup>Hh+</sup> do not modulate autophagic flux*

A-B) LC3 immunoblot (A) of 3T3-L1 lysates treated with 10 $\mu$ g/mL MP<sup>Hh+</sup> in the presence or absence of 100nM bafilomycin A1 (BafA1) for 2h. Autophagic flux quantification (B) was based on measurement of LC3-II/LC3-I ratio in the absence or presence of BafA1.  $\beta$ -actin was used as loading control. No change in autophagic flux was observed following treatment with MP<sup>Hh+</sup>. Results are Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , \* $p < 0.05$ .



## Supplementary Table 1

Primers used	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
36B4	TCCAGGCTTTGGGCATCAC	CTTTATCAGCTGCACATCAC
Ampk $\alpha$ 1	ACGGCCGAGAAGCAGAAGCAC	TCGTGCTTGCCACCTTCAC
aP2	AACACCGAGATTCCTT	ACACATTCCACCACCAG
Camkk2	CCGTTCGAAGGTAGCCGCCG	CGCTGCCTTGCTTCCTTGGGC
CEBP $\alpha$	TCTGCGAGCACGAGACGTC	GCCAGGAACTCGTCGTTGAA
CEPB $\beta$	GCAAGAGCCGCGACAAG	GGCTCGGGCAGCTGCTT
CoupTFII	TCATCTCCTCTGCCAAGCATC	TCTGAGTGAGGCACACGAAGC
GATA2	TGCAACACACCACCCGATACC	CAATTTGCACAACAGGTGCC
Gli1	CAGGGTCCCAGGGTTATGG	AGGTCGAGGCTGGCATCAG
Lkb1	TGACTGCGGCCCACTCT	CGGAACCAGCTGTGCTGCCTA
Ptch1	TGACGGGGTCCTCGCTTACAA	CTACCAGACGCTGTTTAGTCA
PPAR $\gamma$	AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG	TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC
Pref-1	CGAAATAGACGTTCCGGCTT	TCGTA CTGGCCTTTCTCCAG
Runx2	ACGTCCCCGTCCATCCA	TGGCAGTGTCATCATCTGAAATG
Smo	GAGCGTAGCTTCCGGGACTA	CTGGGCCGATTCTTGATCTCA

## Discussion et perspectives

### ***Contribution relative de la voie Hh canonique ou non-canonique in vivo.***

Au cours de cette étude, nous mettons en évidence l'activation d'une voie de signalisation non-canonique par les MP<sup>Hh+</sup>, qui peut être mimée par le GSA-10. Cette voie de signalisation, indépendante des Gli, fait intervenir un axe Smo/Lkb1/Ampk conduisant à l'inhibition de la différenciation adipocytaire.

L'Ampk est un senseur clé de l'homéostasie énergétique cellulaire. Elle est activée lorsque les concentrations intracellulaires d'AMP excèdent les concentrations d'ATP, reflétant un état de privation énergétique. En réponse, l'activation de l'Ampk favorise les voies métaboliques productrices d'ATP (oxydation des acides gras, autophagie, entrée de glucose) et inhibe les processus consommateurs en énergie (lipolyse et lipogenèse *de novo*) (pour revue (Daval et al., 2006)). L'activation de l'Ampk est notamment un des mécanismes clé sous-jacent à l'action anti-diabétique de la metformine (Zhou et al, JCI 2001), et participerait aussi aux effets insulino-sensibilisateurs des thiazolidinediones, agonistes de PPAR utilisés aussi dans le traitement des diabètes (LeBrasseur et al., 2006). Ainsi, l'activation de l'Ampk induite par les MP<sup>Hh+</sup> et le GSA-10 pourrait être à la base d'une réponse métabolique plus globale dans le tissu adipeux.

Ces résultats originaux posent la question de l'existence et par conséquent de la pertinence physiopathologique d'une telle voie non-canonique *in vivo*. L'existence de la voie Hh canonique, caractérisée par une activation des facteurs Gli, est associée avec le développement de nombreux cancers (pour revue (Amakye et al., 2013)). Cependant, des voies de signalisation non-canoniques en réponse à ce morphogène ont été décrites *in vitro* et impliquées dans des processus telles que la migration cellulaire (Polizio et al., 2011), le remodelage du cytosquelette, l'angiogenèse (Chinchilla et al., 2010; Renault et al., 2010), la survie cellulaire (Chinchilla et al., 2010) ou encore la régulation des flux calciques intracellulaires (Belgacem and Borodinsky, 2011; Teperino et al., 2012). Plus récemment, l'activation d'un axe Smo/Lkb1/Ampk par des agonistes/antagonistes de Smo tels que le SAG et la cyclopamine a été mise en évidence dans des adipocytes matures (Teperino et al., 2012). Dans les préadipocytes 3T3-L1, les voies de signalisation Hh activées par le SAG ou la protéine recombinante Shh diffèrent de celles induites par les MP<sup>Hh+</sup>, qui sont quant à elles dépendantes des Gli. Ainsi, l'activation de l'axe Smo/Lkb1/Ampk pourrait être dépendant du contexte cellulaire, d'une forme de Smo spécifiquement activée (sensible au LDE225) et de la présence ou non d'un cil primaire (présent chez les préadipocytes et absents des adipocytes pleinement matures). Des données *in vivo* suggèrent qu'une telle voie canonique couplée à l'activation de

l'Ampk puisse exister. En effet, la délétion du co-récepteur de Shh, *Boc*, réduit l'expression d'UCP-1, cible de l'AMPK, dans les adipocytes bruns (Lee et al., 2015). A l'inverse, l'activation constitutive de la signalisation Hh *via* la délétion des protéines SUFU entraîne une augmentation de l'expression d'UCP-1 dans les adipocytes blancs (Pospisilik et al., 2010). Cependant, la contribution relative de la voie canonique (faisant intervenir les Gli) par rapport à l'activation d'un axe Smo/Lkb1/Ampk dans le métabolisme énergétique de l'organisme reste à déterminer.

Dans ce but, il serait intéressant de comparer les effets de l'injection d'un agoniste de Smo stimulant la voie canonique, *versus* le GSA-10, chez des souris, notamment dans des conditions de surcharge nutritionnelle (régime gras). L'étude de leur phénotype métabolique pourrait permettre de discriminer la contribution relative des voies de signalisation Hh *in vivo*. Ces phénotypes pourraient être de plus comparés à l'injection de MP<sup>Hh+</sup>, qui ont déjà révélé des propriétés pro-angiogéniques et cardio-protectrices *in vivo* (Agouni et al., 2007; Paulis et al., 2015). Plus particulièrement, il sera aussi intéressant de caractériser l'effet de ces agonistes et des MP<sup>Hh+</sup> sur la structure et le métabolisme du tissu adipeux. En effet, Hh a été identifié comme un régulateur clé de la différenciation adipocytaire blanche (Fontaine et al., 2008; Pospisilik et al., 2010; Suh et al., 2006) mais des données montrent aussi que ce morphogène serait un déterminant de la différenciation adipocytaire brune (Lee et al., 2015; Nosavanh et al., 2015). De plus, l'activation de l'Ampk dans les adipocytes pourrait favoriser la « trans-différenciation » de ce tissu vers un tissu adipeux beige, *via* l'induction d'UCP1 et ainsi augmenter la  $\beta$ -oxydation. Enfin, l'activation de l'Ampk par des agonistes Hh dans des tissus insulino-sensibles comme le muscle favorise l'état métabolique général de souris obèses (Teperino et al., 2012). Ainsi, une telle étude permettrait de comparer les conséquences de l'activation des voies de signalisation Hh par différents agonistes sur le métabolisme énergétique global, et d'évaluer la capacité des MP<sup>Hh+</sup> à véhiculer un signal d'activation de Hh à l'échelle de l'organisme.

### ***Criblage de molécules induisant une signalisation Hh non-canonique***

La mise en évidence de cette voie de signalisation Hh non-canonique, induite par les MP<sup>Hh+</sup> et le GSA-10, s'est faite sur la base d'une inhibition de la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 en présence d'IBMX et Dex, molécules classiquement utilisées dans le cocktail classique de différenciation adipocytaire. Les glucocorticoïdes et les modulateurs du taux d'AMPc intracellulaires avaient préalablement été identifiés comme altérant la signalisation canonique Hh dans les préadipocytes, notamment *via* l'inhibition de l'expression des Gli (Pospisilik et al., 2010; Todoric et al., 2011). Nous confirmons que l'ajout seul de Dex ou d'IBMX dans le cocktail d'induction suffit à abolir l'effet inhibiteur

du SAG ou de Shh rec. Ce «criblage cellulaire» nous a ainsi permis de révéler que le GSA-10 était capable d'inhiber l'adipogenèse par l'activation d'une forme de Smo non couplée à l'activation en aval des facteurs Gli. Ces résultats confirment la capacité de cet agoniste de Smo à induire une signalisation non-canonique Hh, comme cela avait été précédemment établi dans des cellules C3H10T1/2 (Gorojankina et al., 2013).

La plupart des agonistes ou antagonistes de Smo ont été identifiés sur la base de criblage mesurant l'activité transcriptionnelle des Gli (pour revue (Ruat et al., 2014)). Cependant, il apparaît que selon leurs concentrations, ces agonistes/antagonistes vont aussi pouvoir activer des voies de signalisation Gli-indépendantes. Ainsi, le GDC-0449 et la cycloamine (qui peut se comporter comme agoniste partiel à faible concentration) sont capables d'activer l'axe Smo/Ampk dans les adipocytes (Teperino et al., 2012). En particulier, ces molécules entraînent une augmentation des concentrations calciques intracellulaires et la contraction musculaire *in vitro* (Teperino et al., 2012). Cette signalisation Hh non-canonique pourrait expliquer l'apparition de crampes musculaires chez les patients traités avec le GDC-0449 (Sekulic et al., 2012; Tang et al., 2012).

La comparaison du potentiel inhibiteur de molécules en utilisant soit un modèle d'induction de la différenciation adipocytaire classique (présence de Dex et d'IBMX) ou un milieu minimal (TZD et Insuline) pourrait constituer la base d'un criblage de molécules activant des voies de signalisation Gli-indépendantes. Nous envisageons ainsi de tester la capacité de molécules capables de moduler l'activité de Smo, incluant les oxystérols ou encore les endocannabinoïdes, à inhiber la différenciation des 3T3-L1 dans ces deux conditions de culture. Cette étude permettrait de mieux comprendre les voies de signalisation Hh régulées par ces lipides. Plus largement, un tel criblage cellulaire pourrait être aussi utilisé pour l'identification de nouveaux agonistes/antagonistes de Smo.

### **Caractérisation des formes Hh associées aux MP**

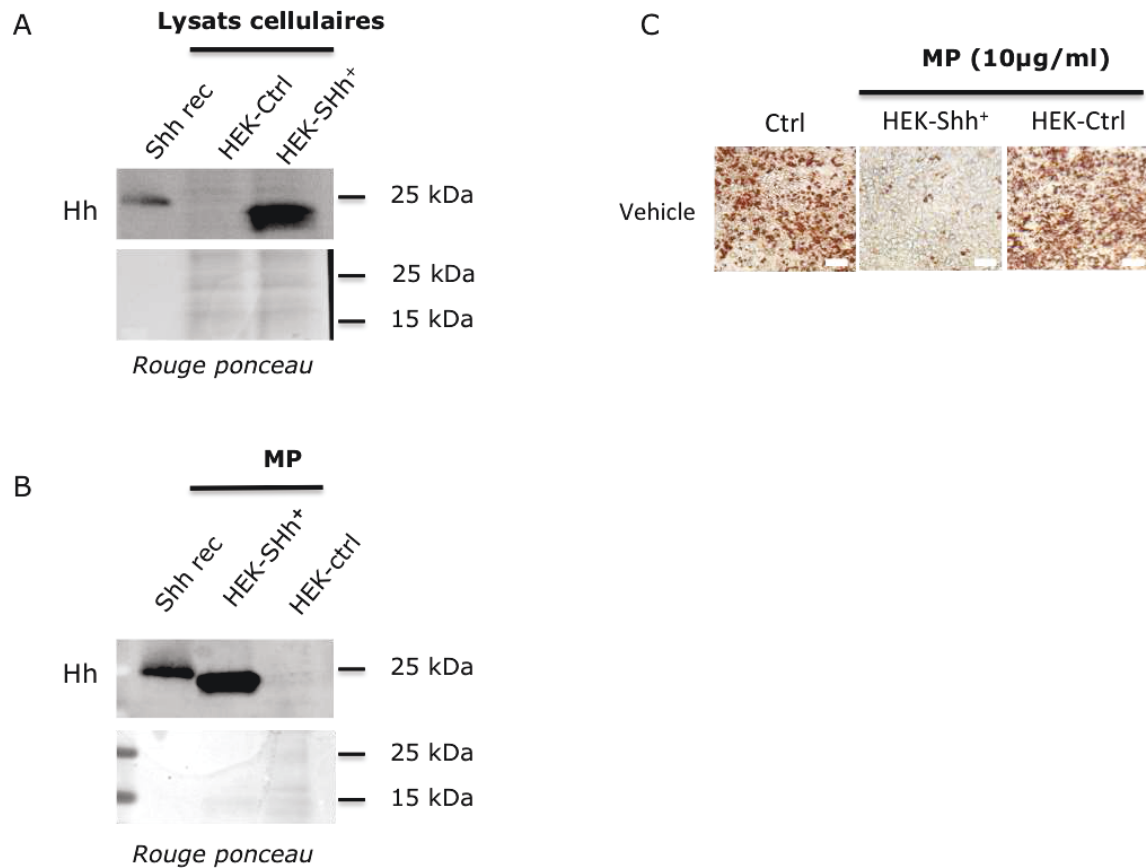
Plusieurs formes de diffusion du morphogène Hh ont été décrites. Parmi celles-ci, des formes libres (Shh N-term lipidée)(Pepinsky et al., 1998; Zeng et al., 2001) ainsi que des formes associées à des vésicules (que ce soit des lipoprotéines ou vésicules extracellulaires) (Mackie et al., 2012; Martínez et al., 2006; Panáková et al., 2005; Tanaka et al., 2005; Vyas et al., 2014; Witek et al., 2009). Etant donné l'origine membranaire des MP, la forme Hh associée aux MP est très probablement lipidée. Or, l'activité et la diffusion de Hh dépendent de ces modifications lipidiques (pour revue (Gallet, 2011)). Des données récentes suggèrent que Hh peut être modifié par différents types d'acides gras qui pourraient influencer son activité (Long et al., 2015). Cependant, aucune caractérisation des formes Hh associée aux VE, comparée aux formes sécrétées libres n'a été rapportée. Afin de caractériser plus avant l'association de Hh aux MP, nous

envisageons d'utiliser un modèle cellulaire simplifié ou l'association de Hh aux MP ne soit pas dépendante d'un stimulus spécifique. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à la lignée cellulaire HEK (Human Embryonic Kidney) qui n'exprime pas de manière endogène le morphogène Hh. Nous avons eu la chance d'obtenir une lignée HEK exprimant Shh (« full-length ») de souris, qui nous a été fournie par le Dr Pascal Peraldi (UMR CNRS 7277, UMR INSERM 1091, Université Nice Sophia-Antipolis) (Forcioli-Conti et al., 2015).

Nos résultats préliminaires montrent que, contrairement aux HEK contrôles, les cellules HEK-Shh expriment le morphogène comme en témoigne la détection d'un signal en western-blot (Figure 35A). Le signal protéique détecté (inférieur à 25kDa) est différent de celui obtenu pour la protéine recombinante suggérant des modifications post-traductionnelles de Hh modifiant son profil de migration. Cette lignée est capable de produire des exosomes (Sokolova et al., 2011; Vyas et al., 2014) et des MP (Hoang et al., 2011). A partir des surnageants de culture cellulaire (48h), nous avons ensuite isolé des MP par centrifugation à 13 000g de ces cellules HEK-Shh<sup>+</sup> et HEK-contrôle. Nous retrouvons la présence de Shh sur les MP dérivées des cellules HEK-Shh<sup>+</sup> alors que celles isolées des cellules HEK contrôles en sont dépourvues (Figure 35B). Finalement, nous avons voulu tester si ces MP (dérivées des cellules HEK-Shh<sup>+</sup>) avaient aussi un potentiel inhibiteur, à l'image des MP<sup>Hh+</sup> dérivées des lymphocytes T CEM. Nos premiers résultats suggèrent que les MP dérivées des HEK-Shh<sup>+</sup> (à une concentration de 10µg/mL) sont capables d'inhiber la différenciation adipocytaire de 3T3-L1 en présence d'un cocktail classique de différenciation (contenant de la Dex et de l'IBMX) tandis que les MP dérivées des cellules HEK contrôles n'ont pas d'effet sur l'adipogenèse (Figure 35C). Ceci suggère que ces MP libérées par les HEK-Shh<sup>+</sup> pourraient inhiber l'adipogenèse de manière Gli-indépendante. Cette signalisation non-canonique pourrait être une caractéristique des formes Hh associées aux MP sur le préadipocyte. Ces résultats préliminaires sont actuellement en cours de répétition. L'utilisation de ce nouveau modèle cellulaire pourrait permettre de mieux caractériser la structure du morphogène Hh associée aux MP (monomères? multimères?) ainsi que l'importance des modifications lipidiques dans cette association. Une des pistes envisagées est de transfecter des HEK contrôles avec différentes constructions de Hh, mutées ou non sur les sites d'attachement des lipides. Ceci permettrait d'étudier le rôle des lipides dans l'association des protéines Hh aux MP et d'évaluer conséquences fonctionnelles de telles MP.

Une étude similaire a été réalisée à partir de lipoprotéines portant des formes mutantes ou non de Shh chez la Drosophile. Ces travaux ont révélé des fonctions différentes entre Hh associé aux lipoprotéines et Hh diffusant librement (Palm et al., 2013). Le développement d'un tel modèle cellulaire pourrait ainsi permettre de faire le lien entre

l'existence de formes de Hh lipidées associées aux MP et leur capacité à activer des voies de signalisation Hh canonique vs non-canonique dans un type cellulaire spécifique.



**Figure 35 : Isolation des MP à partir d'une lignée HEK exprimant le morphogène Shh.**

A - Validation de l'expression de Shh dans les cellules HEK-Shh<sup>+</sup> à partir de lysats cellulaires par comparaison aux HEK-ctrl n'exprimant pas Shh. 10µg de chaque lysat cellulaire a été déposé et comparé à 5ng de la protéine recombinante (Shh rec). Shh détecté dans les lysats cellulaires de HEK-Shh<sup>+</sup> présente un profil de migration différent de Shh rec, qui pourrait être lié à la présence de modifications lipidiques.

B - Les MP isolées à partir des surnageants de cellules HEK-Shh<sup>+</sup> portent le morphogène Shh. 10 µg de chaque préparation de MP ont été déposés et comparés à 5ng de Shh rec.

C - Les MP dérivées des HEK-Shh<sup>+</sup> inhibent spécifiquement la différenciation adipocytaire des 3T3-L1. Coloration Oil Red O de 3T3-L1 différenciés en présence du cocktail classique d'induction (IBMX, Dex et insuline) et incubés en présence de 10µg/mL de MP dérivées des HEK-Shh<sup>+</sup> ou HEK-ctrl respectivement. L'échelle indique 50µm.

### **Relevance physiopathologique des MP<sup>Hh+</sup>**

Au cours de notre étude, nous montrons le relargage par les lymphocytes T CEM de MP portant spécifiquement Hh suite à une combinaison de stimuli pro-apoptotique/hyperprolifératif, comparé à un stimulus apoptotique seul. La libération des MP<sup>Hh+</sup> par ces lymphocytes *in vitro* soulève la question de la capacité de ces cellules, voire d'autres types cellulaires à émettre des MP portant le morphogène *in vivo*. Des études préalables du laboratoire montrent que des MP portant Hh sont présentes dans la circulation (Martínez et al., 2006). De manière analogue, le morphogène Hh peut diffuser *via* les lipoprotéines circulantes (Panáková et al., 2005). Cependant, aucune étude n'a mesuré la quantité de morphogène diffusant de manière libre ou associé à des VE à partir d'échantillons sanguins. De plus, il n'existe aucune donnée concernant la variation de ces MP<sup>Hh+</sup> dans des conditions pathologiques. Des données *in vitro* ont démontré la capacité de cellules hépatiques à produire des MP<sup>Hh+</sup> qui ont des propriétés pro-fibrotiques (Witek et al., 2009). Hh pourrait en effet favoriser la fibrose hépatique chez l'homme (pour revue (Hu et al., 2015)). Enfin, au cours de l'obésité, l'expression des acteurs moléculaires de la signalisation Hh est diminuée dans des conditions d'obésité (Todoric et al., 2011). Cette inhibition pourrait être liée à des niveaux élevés d'INF $\gamma$ , qui régule négativement la signalisation Hh (Todoric et al., 2011).

Dans ce contexte, il serait intéressant de mesurer par cytométrie en flux la concentration de MP<sup>Hh+</sup> chez des patients obèses souffrant de pathologies métaboliques. Plus particulièrement, un phénotypage de ces MP<sup>Hh+</sup> à l'aide de marqueurs antigéniques membranaires permettrait en outre de déterminer leur origine cellulaire. Enfin, la corrélation du taux de MP<sup>Hh+</sup> avec des données métaboliques, notamment hépatiques, pourrait permettre d'évaluer la relation entre taux de MP<sup>Hh+</sup> circulantes et le degré d'avancement d'une fibrose hépatique. Ces analyses ont actuellement été freinées par le fait que nous n'avons à ce jour pas réussi à valider un anticorps anti-Hh permettant une telle analyse en cytométrie en flux.

## Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer la capacité des adipocytes à sécréter des VE. Nos données démontrent la capacité des cellules adipeuses à libérer des VE que l'on peut séparer en deux sous-types, MP et exosomes, et qui présentent des profils protéiques différents. De surcroît, la production de ces VE est stimulée dans un contexte d'obésité.

Parallèlement, nous révélons la capacité de MP portant le morphogène Hh à inhiber la différenciation adipocytaire *via* une voie de signalisation Hh non-canonique impliquant l'activation de l'Ampk et indépendante des facteurs de transcription Gli.

L'ensemble de ce travail illustre la capacité des VE à véhiculer des messages biologiques qui peuvent moduler les réponses métaboliques dans les cellules cibles. De futurs travaux seront nécessaires afin d'étudier la contribution de ces VE dans les dysfonctions métaboliques associées à l'obésité. Nos résultats illustrent également la complexité en terme de composition des VE qui diffère selon le sous-type étudié, et probablement en terme fonctionnel puisqu'elles sont capables d'induire des réponses cellulaires différentes de celles classiquement décrites.

Compte-tenu de leur potentiel à véhiculer une information biologique, ces VE représentent des vecteurs thérapeutiques potentiels. Cependant, à l'image de nos données, il est essentiel de les caractériser et de définir leur rôle dans des situations biologiques bien définies avant d'envisager une utilisation de ces VE en clinique.





## **Références bibliographiques**

- Agouni, A., Mostefai, H.A., Porro, C., Carusio, N., Favre, J., Richard, V., Henrion, D., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R.** (2007). Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* *21*, 2735–2741.
- Agouni, A., Lagrue-Lak-Hal, A.H., Ducluzeau, P.H., Mostefai, H.A., Draunet-Busson, C., Leftheriotis, G., Heymes, C., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R.** (2008a). Endothelial Dysfunction Caused by Circulating Microparticles from Patients with Metabolic Syndrome. *Am. J. Pathol.* *173*, 1210–1219.
- Agouni, A., Lagrue-Lak-Hal, A.H., Ducluzeau, P.H., Mostefai, H.A., Draunet-Busson, C., Leftheriotis, G., Heymes, C., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R.** (2008b). Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am. J. Pathol.* *173*, 1210–1219.
- Aharon, A., Tamari, T., and Brenner, B.** (2008). Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb. Haemost.*
- Ailhaud, G., Grimaldi, P., and Nègre, R. (1992). Cellular and Molecular Aspects of Adipose Tissue Development. *Annu. Rev. Nutr.* *12*, 207–233.
- Amabile, N., Guérin, A.P., Leroyer, A., Mallat, Z., Nguyen, C., Boddaert, J., London, G.M., Tedgui, A., and Boulanger, C.M.** (2005). Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *16*, 3381–3388.
- Amakye, D., Jagani, Z., and Dorsch, M.** (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1410–1422.
- Andriantsitohaina, R., Gaceb, A., Vergori, L., and Martínez, M.C.** (2012). Microparticles as Regulators of Cardiovascular Inflammation. *Trends Cardiovasc. Med.* *22*, 88–92.
- Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Chul Kim, J., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., et al.** (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet–Biedl syndrome. *Nature* *425*, 628–633.
- Arner, P., Bernard, S., Salehpour, M., Possnert, G., Liebl, J., Steier, P., Buchholz, B.A., Eriksson, M., Arner, E., Hauner, H., et al.** (2011). Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* *478*, 110–113.
- Ayers, K.L., and Thérond, P.P.** (2010). Evaluating Smoothed as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling. *Trends Cell Biol.* *20*, 287–298.
- Ayers, K.L., Gallet, A., Staccini-Lavenant, L., and Thérond, P.P.** (2010). The Long-Range Activity of Hedgehog Is Regulated in the Apical Extracellular Space by the Glypican Dally and the Hydrolase Notum. *Dev. Cell* *18*, 605–620.
- Baerga, R., and Zhang, Y.** (2009). Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* *5*, 1118.
- 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.
- Banfi, C., Brioschi, M., Wait, R., Begum, S., Gianazza, E., Pirillo, A., Mussoni, L., and Tremoli, E.** (2005). Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *PROTEOMICS* *5*, 4443–4455.
- Baron, M., Boulanger, C.M., Staels, B., and Tailleux, A.** (2012). Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 1365–1376.
- Bassé, F., Gaffet, P., Rendu, F., and Bienvenüe, A.** (1993). Translocation of spin-labeled phospholipids through plasma membrane during thrombin- and ionophore A23187-induced platelet activation. *Biochemistry (Mosc.)* *32*, 2337–2344.

- Belgacem, Y.H., and Borodinsky, L.N.** (2011). Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4482–4487.
- Benameur, T., Soleti, R., Porro, C., Andriantsitohaina, R., and Martinez, M.C.** (2010). Microparticles Carrying Sonic Hedgehog Favor Neovascularization through the Activation of Nitric Oxide Pathway in Mice. *PLoS ONE* *5*.
- Berbari, N.F., Pasek, R.C., Malarkey, E.B., Yazdi, S.M.Z., McNair, A.D., Lewis, W.R., Nagy, T.R., Kesterson, R.A., and Yoder, B.K.** (2013). Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 7796–7801.
- Bernlohr, D.A., Coe, N.R., and LiCata, V.J.** (1999). Fatty acid trafficking in the adipocyte. *Semin. Cell Dev. Biol.* *10*, 43–49.
- Beyer, C., and Pisetsky, D.S.** (2010). The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* *6*, 21–29.
- Bidet, M., Joubert, O., Lacombe, B., Ciantar, M., Nehme, R., Mollat, P., Bretillon, L., Faure, H., Bittman, R., Ruat, M., et al.** (2011). The Hedgehog Receptor Patched Is Involved in Cholesterol Transport. *PLoS ONE* *6*.
- Bijlsma, M.F., Spek, C.A., Zivkovic, D., van de Water, S., Rezaee, F., and Peppelenbosch, M.P.** (2006). Repression of Smoothed by Patched-Dependent (Pro-)Vitamin D3 Secretion. *PLoS Biol.* *4*.
- Bilkovski, R., Schulte, D.M., Oberhauser, F., Mauer, J., Hampel, B., Gutschow, C., Krone, W., and Laudes, M.** (2011). Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans. *Int. J. Obes.* *35*, 1450–1454.
- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., and Hivroz, C.** (2002). TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ζ Complex. *J. Immunol.* *168*, 3235–3241.
- Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., and Théry, C.** (2012). Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* *1*.
- Boon, R.A., and Vickers, K.C.** (2013). Intercellular Transport of MicroRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 186–192.
- Boulanger, C.M., Amabile, N., and Tedgui, A.** (2006). Circulating Microparticles: A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease. *Hypertension* *48*, 180–186.
- Boulanger, C.-M., Leroyer, A.-S., Amabile, N., and Tedgui, A.** (2008). Microparticules endothéliales circulantes : un nouveau marqueur du dysfonctionnement vasculaire. *Ann. Cardiol. Angéiologie* *57*, 149–154.
- Briscoe, J., and Ericson, J.** (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 43–49.
- Briscoe, J., and Théron, P.P.** (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 416–429.
- Brodsky, S.V., Malinowski, K., Golightly, M., Jesty, J., and Goligorsky, M.S.** (2002). Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Formation of Endothelial Microparticles With Procoagulant Potential. *Circulation* *106*, 2372–2378.
- Brouwers, J.F., Aalberts, M., Jansen, J.W.A., van Niel, G., Wauben, M.H., Stout, T.A.E., Helms, J.B., and Stoorvogel, W.** (2013). Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *PROTEOMICS* *13*, 1660–1666.
- Buhman, K.K., Wang, L.C., Tang, Y., Swietlicki, E.A., Kennedy, S., Xie, Y., Liu, Z.-Y., Burkly, L.C., Levin, M.S., Rubin, D.C., et al.** (2004). Inhibition of Hedgehog Signaling Protects Adult Mice from Diet-Induced Weight Gain. *J. Nutr.* *134*, 2979–2984.
- Burger, D., Montezano, A.C., Nishigaki, N., He, Y., Carter, A., and Touyz, R.M.** (2011).

Endothelial Microparticle Formation by Angiotensin II Is Mediated via Ang II Receptor Type I/NADPH Oxidase/ Rho Kinase Pathways Targeted to Lipid Rafts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 1898–1907.

**Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.-A., Dickson, B.J., and Basler, K.** (1999). Dispatched, a Novel Sterol-Sensing Domain Protein Dedicated to the Release of Cholesterol-Modified Hedgehog from Signaling Cells. *Cell* *99*, 803–815.

**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* *10*, 1528–1542.

**Callejo, A., Culi, J., and Guerrero, I.** (2008). Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 912–917.

**Callejo, A., Biloni, A., Mollica, E., Gorfinkiel, N., Andrés, G., Ibáñez, C., Torroja, C., Doglio, L., Sierra, J., and Guerrero, I.** (2011). Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the *Drosophila* wing disk epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12591–12598.

**Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J.L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Hen, A.B., Bedossa, P., et al.** (2006). Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes* *55*, 1554–1561.

**Cao, H., Sekiya, M., Erikci, M., Burak, M.F., Mayers, J.R., White, A., Inouye, K., Rickey, L.M., Ercal, B.C., Furuhashi, M., et al.** (2013). Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab.* *17*, 768–778.

**Carroll, C.E., Marada, S., Stewart, D.P., Ouyang, J.X., and Ogden, S.K.** (2012). The extracellular loops of Smoothed play a regulatory role in control of Hedgehog pathway activation. *Development* *139*, 612–621.

**Cauwenberghs, S., Feijge, M.A.H., Harper, A.G.S., Sage, S.O., Curvers, J., and Heemskerk, J.W.M.** (2006). Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* *580*, 5313–5320.

**Chamoun, Z., Mann, R.K., Nellen, D., Kessler, D.P. von, Bellotto, M., Beachy, P.A., and Basler, K.** (2001). Skinny Hedgehog, an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science* *293*, 2080–2084.

**Chaput, N., and Théry, C.** (2011). Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin. Immunopathol.* *33*, 419–440.

**Chen, M.-H.** (2004). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev.* *18*, 641–659.

**Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., and Beachy, P.A.** (2002). Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 14071–14076.

**Chen, W., Ren, X.-R., Nelson, C.D., Barak, L.S., Chen, J.K., Beachy, P.A., Sauvage, F. de, and Lefkowitz, R.J.** (2004). Activity-Dependent Internalization of Smoothed Mediated by  $\beta$ -Arrestin 2 and GRK2. *Science* *306*, 2257–2260.

**Chen, Y., Sasai, N., Ma, G., Yue, T., Jia, J., Briscoe, J., and Jiang, J.** (2011). Sonic Hedgehog Dependent Phosphorylation by CK1 $\alpha$  and GRK2 Is Required for Ciliary Accumulation and Activation of Smoothed. *PLoS Biol.* *9*.

**Cheng, V., Kashyap, S.R., Schauer, P.R., Kirwan, J.P., and McCrae, K.R.** (2013). Restoration of Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes Following Bariatric Surgery is Associated with Reduction in Microparticles. *Surg. Obes. Relat. Dis. Off. J. Am. Soc. Bariatric Surg.* *9*, 207–212.

**Chiang, C., Litington, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy,**

- P.A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Publ. Online* 03 Oct. 1996 Doi101038383407a0 383, 407–413.
- Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M.G., and Riobo, N.A.** (2010). Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 570–579.
- Christiansen, T., Richelsen, B., and Bruun, J.M.** (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int. J. Obes.* 29, 146–150.
- Christopher Boehlke, Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Bredt, S., Beyer, T., Janusch, H., Hamann, C., Gödel, M., et al.** (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat. Cell Biol.* 12, 1115–1122.
- Chuang, P.-T., and McMahon, A.P.** (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617–621.
- Cinti, S.** (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 9–15.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S.** (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46, 2347–2355.
- Colombo, M., Moita, C., Niel, G. van, 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.
- Combes, V., Simon, A.-C., Grau, G.-E., Arnoux, D., Camoin, L., Sabatier, F., Mutin, M., Sanmarco, M., Sampol, J., and Dignat-George, F.** (1999). In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* 104, 93–102.
- Del Conde, I.** (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 106, 1604–1611.
- Connor, D.E., Exner, T., Ma, D.D.F., and Joseph, J.E.** (2010). The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib: *Thromb. Haemost.* 103, 1044–1052.
- Cooper, M.K., Wassif, C.A., Krakowiak, P.A., Taipale, J., Gong, R., Kelley, R.I., Porter, F.D., and Beachy, P.A.** (2003). A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat. Genet.* 33, 508–513.
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y.R., and Reiter, J.F.** (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018–1021.
- Cordazzo, C., Neri, T., Petrini, S., Lombardi, S., Balia, C., Cianchetti, S., Carmazzi, Y., Paggiaro, P., Pedrinelli, R., and Celi, A.** (2013). Angiotensin II induces the generation of procoagulant microparticles by human mononuclear cells via an angiotensin type 2 receptor-mediated pathway. *Thromb. Res.* 131, e168–e174.
- Cristancho, A.G., and Lazar, M.A.** (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 722–734.
- Dachary-Prigent, J., Pasquet, J.-M., Freyssinet, J.-M., and Nurden, A.T.** (1995). Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 11625–11634.
- D'Angelo, G., Matusek, T., Pizette, S., and Théron, P.P.** (2015). Endocytosis of Hedgehog

through Dispatched Regulates Long-Range Signaling. *Dev. Cell* 32, 290–303.

**Daval, M., Foufelle, F., and Ferré, P.** (2006). Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J. Physiol.* 574, 55–62.

**Davenport, J.R., Watts, A.J., Roper, V.C., Croyle, M.J., van Groen, T., Wyss, J.M., Nagy, T.R., Kesterson, R.A., and Yoder, B.K.** (2007). Conditional disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to hyperphagia-induced obesity and slow onset cystic kidney disease. *Curr. Biol. CB* 17, 1586–1594.

**DeCamp, D.L., Thompson, T.M., Sauvage, F.J. de, and Lerner, M.R.** (2000). Smoothed Activates Gai-mediated Signaling in Frog Melanophores. *J. Biol. Chem.* 275, 26322–26327.

**DeClercq, V., d' Eon, B., and McLeod, R.S.** (2015). Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 1123–1133.

**Deng, Z., Poliakov, A., Hardy, R.W., Clements, R., Liu, C., Liu, Y., Wang, J., Xiang, X., Zhang, S., Zhuang, X., et al.** (2009). Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance. *Diabetes* 58, 2498–2505.

**Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Iacono, M.L., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., and Camussi, G.** (2007). Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440–2448.

**Després, J.-P., and Lemieux, I.** (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887.

**Després, JP.** (2001). Distribution et métabolisme des masses grasses.

**Dorn, K.V., Hughes, C.E., and Rohatgi, R.** (2012). A Smoothed-Evc2 complex transduces the Hedgehog signal at primary cilia. *Dev. Cell* 23, 823–835.

**D'Souza-Schorey, C., and Clancy, J.W.** (2012). Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.* 26, 1287–1299.

**Dugail, I., and Lay, S.L.** (2013). Physiologie de la gouttelette lipidique adipocytaire. In *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux*, (Springer Paris), pp. 123–141.

**Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S.** (2007). Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 79–101.

**Eaton, S.** (2008). Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 437–445.

**EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O., and Wood, M.J.A.** (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 347–357.

**Esposito, K., Ciotola, M., Schisano, B., Gualdiero, R., Sardelli, L., Misso, L., Giannetti, G., and Giugliano, D.** (2006a). Endothelial Microparticles Correlate with Endothelial Dysfunction in Obese Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3676–3679.

**Esposito, K., Ciotola, M., Schisano, B., Gualdiero, R., Sardelli, L., Misso, L., Giannetti, G., and Giugliano, D.** (2006b). Endothelial Microparticles Correlate with Endothelial Dysfunction in Obese Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3676–3679.

**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.

**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* 11, 675–687.

- Fleury, A., Martinez, M.C., and Le Lay, S.** (2014). Extracellular Vesicles as Therapeutic Tools in Cardiovascular Diseases. *Front. Immunol.* *5*.
- Fliegauf, M., Benzing, T., and Ocran, H.** (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 880–893.
- Fontaine, C., Cousin, W., Plaisant, M., Dani, C., and Peraldi, P.** (2008). Hedgehog Signaling Alters Adipocyte Maturation of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* *26*, 1037–1046.
- Forcioli-Conti, N., Lacas-Gervais, S., Dani, C., and Peraldi, P.** (2015). The primary cilium undergoes dynamic size modifications during adipocyte differentiation of human adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *458*, 117–122.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., and Foufelle, F.** (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 12737–12742.
- Foufelle, F., and Ferré, P.** (2013). Mécanisme de stockage et de synthèse des acides gras et des triglycérides dans le tissu adipeux blanc. In *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux*, (Springer Paris), pp. 101–122.
- Fox, J.E., Austin, C.D., Boyles, J.K., and Steffen, P.K.** (1990). Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J. Cell Biol.* *111*, 483–493.
- Friedman, J.** (2014). 20 YEARS OF LEPTIN: Leptin at 20: an overview. *J. Endocrinol.* *223*, T1–T8.
- Fritzsching, B., Schwer, B., Kartenbeck, J., Pedal, A., Horejsi, V., and Ott, M.** (2002). Release and Intercellular Transfer of Cell Surface CD81 Via Microparticles. *J. Immunol.* *169*, 5531–5537.
- Frohnert, B.I., and Bernlohr, D.A.** (2000). Regulation of fatty acid transporters in mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* *39*, 83–107.
- Furlan-Freguia, C., Marchese, P., Gruber, A., Ruggeri, Z.M., and Ruf, W.** (2011). P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 2932–2944.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I.** (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* *114*, 1752–1761.
- Gaceb, A., Martinez, M.C., and Andriantsitohaina, R.** (2014). Extracellular vesicles: New players in cardiovascular diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *50*, 24–28.
- Gaffet, P., Bettache, N., and Bienvenuee, A.** (1995). Transverse Redistribution of Phospholipids during Human Platelet Activation: Evidence for a Vectorial Outflux Specific to Aminophospholipids. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 6762–6769.
- Gagné-Sansfaçon, J., Allaire, J.M., Jones, C., Boudreau, F., and Perreault, N.** (2014). Loss of Sonic Hedgehog Leads to Alterations in Intestinal Secretory Cell Maturation and Autophagy. *PLoS ONE* *9*, e98751.
- Galic, S., Oakhill, J.S., and Steinberg, G.R.** (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* *316*, 129–139.
- Gallet, A.** (2011). Hedgehog morphogen: from secretion to reception. *Trends Cell Biol.* *21*, 238–246.
- Gallet, A., Rodriguez, R., Ruel, L., and Therond, P.P.** (2003). Cholesterol Modification of Hedgehog Is Required for Trafficking and Movement, Revealing an Asymmetric Cellular Response to Hedgehog. *Dev. Cell* *4*, 191–204.
- Gallet, A., Ruel, L., Staccini-Lavenant, L., and Théron, P.P.** (2006). Cholesterol modification



is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Development* 133, 407–418.

**Garcia, B.A., Smalley, D.M., Cho, Shabanowitz, J., Ley, K., and Hunt, D.F.** (2005). The Platelet Microparticle Proteome. *J. Proteome Res.* 4, 1516–1521.

**Gardiner, C., Harrison, P., Belting, M., Böing, A., Campello, E., Carter, B.S., Collier, M.E., Coumans, F., Ettelaie, C., van Es, N., et al.** (2015). Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis – discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. *J. Extracell. Vesicles* 4.

**Gauley, J., and Pisetsky, D.S.** (2010). The release of microparticles by RAW 264.7 macrophage cells stimulated with TLR ligands. *J. Leukoc. Biol.* 87, 1115–1123.

**Gautier, V.** (2012). Développement de méthodes quantitatives sans marquage pour l'étude protéomique des cellules endothéliales. Toulouse 3

**Gesta, S., Tseng, Y.-H., and Kahn, C.R.** (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256.

**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.

**Giesen, P.L., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roqué, M., Fallon, J.T., Badimon, J.J., Himer, J., Riederer, M.A., and Nemerson, Y.** (1999). Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2311–2315.

**Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., and Cinti, S.** (2014). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol.* 170, R159–R171.

**Goetz, S.C., and Anderson, K.V.** (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* 11, 331–344.

**Goichot, B., Grunebaum, L., Desprez, D., Vinzio, S., Meyer, L., Schlienger, J.L., Lessard, M., and Simon, C.** (2006). Circulating procoagulant microparticles in obesity. *Diabetes Metab.* 32, 82–85.

**Gorojankina, T., Hoch, L., Faure, H., Roudaut, H., Traiffort, E., Schoenfelder, A., Girard, N., Mann, A., Manetti, F., Solinas, A., et al.** (2013). Discovery, Molecular and Pharmacological Characterization of GSA-10, a Novel Small-Molecule Positive Modulator of Smoothed. *Mol. Pharmacol.* 83, 1020–1029.

**Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S.** (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol. Rev.* 78, 783–809.

**Grover, V.K., Valadez, J.G., Bowman, A.B., and Cooper, M.K.** (2011). Lipid Modifications of Sonic Hedgehog Ligand Dictate Cellular Reception and Signal Response. *PLoS ONE* 6, e21353.

**Gündüz, Z., Dursun, İ., Tülpar, S., Baştuğ, F., Baykan, A., Yıkılmaz, A., Patiroğlu, T., Poyrazoğlu, H.M., Akın, L., Yel, S., et al.** (2012). Increased endothelial microparticles in obese and overweight children. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 25, 1111–1117.

**Hafner, A.-L., and Dani, C.** (2014). Human induced pluripotent stem cells: A new source for brown and white adipocytes. *World J. Stem Cells* 6, 467–472.

**Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A.B., Gillies, S., et al.** (1996). Mutations of the Human Homolog of *Drosophila* patched in the Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell* 85, 841–851.

**Halberg, N., Wernstedt, I., and Scherer, P.E.** (2008). The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37, 753 – xi.

- Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M.E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A.D., Sherwani, S., Wang, Z.V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U.J., et al.** (2009). Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4467–4483.
- Hanson, P.I., and Cashikar, A.** (2012). Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 337–362.
- 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.
- Haycraft, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., and Yoder, B.K.** (2005). Gli2 and Gli3 Localize to Cilia and Require the Intraflagellar Transport Protein Polaris for Processing and Function. *PLoS Genet.* *1*.
- Heinrich, L.F., Andersen, D.K., Cleasby, M.E., and Lawson, C.** (2015). Long-term high fat feeding of rats results in increased numbers of circulating microvesicles with pro-inflammatory effects on endothelial cells. *Br. J. Nutr.* *113*, 1704–1711.
- Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L., and Giannis, A.** (2010). Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg. Med. Chem.* *18*, 6613–6624.
- Hill, R.E., Heaney, S.J.H., and Lettice, L.A.** (2003). Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies. *J. Anat.* *202*, 13–20.
- Hjuler Nielsen, M., Irvine, H., Vedel, S., Raungaard, B., Beck-Nielsen, H., and Handberg, A.** (2015). Elevated Atherosclerosis-Related Gene Expression, Monocyte Activation and Microparticle-Release Are Related to Increased Lipoprotein-Associated Oxidative Stress in Familial Hypercholesterolemia. *PLoS ONE* *10*, e0121516.
- Hoang, T.Q., Rampon, C., Freyssinet, J.-M., Vriza, S., and Kerbiriou-Nabias, D.** (2011). A method to assess the migration properties of cell-derived microparticles within a living tissue. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1810*, 863–866.
- Hoch, L., Faure, H., Roudaut, H., Schoenfelder, A., Mann, A., Girard, N., Bihannic, L., Ayrault, O., Petricci, E., Taddei, M., et al.** (2015). MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor. *FASEB J.* fj.14–267849.
- Hoen, E.N.M.N.-'t, van der Vlist, E.J., Aalberts, M., Mertens, H.C.H., Bosch, B.J., Bartelink, W., Mastrobattista, E., van Gaal, E.V.B., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G.J.A., et al.** (2012). Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *8*, 712–720.
- Hooper, J.E., and Scott, M.P.** (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 306–317.
- Hristov, M.** (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* *104*, 2761–2766.
- Hu, L., Lin, X., Lu, H., Chen, B., and Bai, Y. (2015). An Overview of Hedgehog Signaling in Fibrosis. *Mol. Pharmacol.* *87*, 174–182.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V.** (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* *426*, 83–87.
- Humke, E.W., Dorn, K.V., Milenkovic, L., Scott, M.P., and Rohatgi, R.** (2010). The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* *24*, 670–682.
- Incardona, J.P., Lee, J.H., Robertson, C.P., Enga, K., Kapur, R.P., and Roelink, H.** (2000). Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 12044–12049.

- Incardona, J.P., Gruenberg, J., and Roelink, H.** (2002). Sonic Hedgehog Induces the Segregation of Patched and Smoothed in Endosomes. *Curr. Biol.* *12*, 983–995.
- Ingham, P.W., and McMahon, A.P.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* *15*, 3059–3087.
- Ingham, P.W., Nakano, Y., and Seger, C.** (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 393–406.
- Ishikawa, H., and Marshall, W.F.** (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 222–234.
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhallah, 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.
- James, A.W.** (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica* *2013*, 684736.
- James, A.W., Leucht, P., Levi, B., Carre, A.L., Xu, Y., Helms, J.A., and Longaker, M.T.** (2010). Sonic Hedgehog Influences the Balance of Osteogenesis and Adipogenesis in Mouse Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue Eng. Part A* *16*, 2605–2616.
- James, A.W., Pang, S., Askarinam, A., Corselli, M., Zara, J.N., Goyal, R., Chang, L., Pan, A., Shen, J., Yuan, W., et al.** (2012). Additive Effects of Sonic Hedgehog and Nell-1 Signaling in Osteogenic Versus Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells Dev.* *21*, 2170–2178.
- Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Soderland, C., Horstman, L.L., and Ahn, Y.S.** (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* *109*, 175–180.
- Jimenez-Sanchez, M., Menzies, F.M., Chang, Y.-Y., Simecek, N., Neufeld, T.P., and Rubinsztein, D.C.** (2012). The Hedgehog signalling pathway regulates autophagy. *Nat. Commun.* *3*, 1200.
- Johnson, R.L., Milenkovic, L., and Scott, M.P.** (2000). In Vivo Functions of the Patched Protein: Requirement of the C Terminus for Target Gene Inactivation but Not Hedgehog Sequestration. *Mol. Cell* *6*, 467–478.
- Johnstone, R.M.** (2006). Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells. Mol. Dis.* *36*, 315–321.
- 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*.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al.** (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* *116*, 1494–1505.
- Kanda, S., Mochizuki, Y., Suematsu, T., Miyata, Y., Nomata, K., and Kanetake, H.** (2003). Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *278*, 8244–8249.
- Karpen, H.E., Bukowski, J.T., Hughes, T., Gratton, J.-P., Sessa, W.C., and Gailani, M.R.** (2001). The Sonic Hedgehog Receptor Patched Associates with Caveolin-1 in Cholesterol-rich Microdomains of the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* *276*, 19503–19511.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M.** (2015). Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat. Cell Biol.* *17*, 759–770.
- Keeler, R.F., and Binns, W.** (1968). Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand).

V. Comparison of cyclopiian effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology* 1, 5–10.

**Kennedy, G.C.** (1953). The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 140, 578–592.

**Khaliullina, H., Panáková, D., Eugster, C., Riedel, F., Carvalho, M., and Eaton, S.** (2009). Patched regulates Smoothed trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development* 136, 4111–4121.

**Khaliullina, H., Bilgin, M., Sampaio, J.L., Shevchenko, A., and Eaton, S.** (2015). Endocannabinoids are conserved inhibitors of the Hedgehog pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 3415–3420.

**Kim, J., Hsia, E.Y.C., Kim, J., Sever, N., Beachy, P.A., and Zheng, X.** (2014). Simultaneous measurement of smoothed entry into and exit from the primary cilium. *PLoS One* 9, e104070.

**Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., and Spiegelman, B.M.** (1998). ADD1/SREBP1 activates PPAR $\gamma$  through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4333–4337.

**Kim, S.H., Bianco, N.R., Shufesky, W.J., Morelli, A.E., and Robbins, P.D.** (2007). MHC Class II+ Exosomes in Plasma Suppress Inflammation in an Antigen-Specific and Fas Ligand/Fas-Dependent Manner. *J. Immunol.* 179, 2235–2241.

**Kise, Y., Morinaka, A., Teglund, S., and Miki, H.** (2009). Sufu recruits GSK3 $\beta$  for efficient processing of Gli3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 569–574.

**Koeck, E.S., Iordanskaia, T., Sevilla, S., Ferrante, S.C., Hubal, M.J., Freishtat, R.J., and Nadler, E.P.** Adipocyte exosomes induce transforming growth factor beta pathway dysregulation in hepatocytes: a novel paradigm for obesity-related liver disease. *J. Surg. Res.*

**Komai, A.M., Brännmark, C., Musovic, S., and Olofsson, C.S.** (2014). PKA-independent cAMP stimulation of white adipocyte exocytosis and adipokine secretion: modulations by Ca<sup>2+</sup> and ATP. *J. Physiol.* 592, 5169–5186.

**Konieczny, S.F., and Emerson Jr., C.P.** (1984). 5-azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: Evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* 38, 791–800.

**Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W., and Lefkowitz, R.J.** (2008).  $\beta$ -arrestin mediated localization of Smoothed to the primary cilium. *Science* 320, 1777–1781.

**Kralisch, S., Ebert, T., Lossner, U., Jessnitzer, B., Stumvoll, M., and Fasshauer, M.** (2014). Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int. J. Obes.*

**Kranendonk, M.E.G., Visseren, F.L.J., van Balkom, B.W.M., Nolte-’t Hoen, E.N.M., van Herwaarden, J.A., de Jager, W., Schipper, H.S., Brenkman, A.B., Verhaar, M.C., Wauben, M.H.M., et al.** (2014a).

Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity* 22, 1296–1308.

**Kranendonk, M.E.G., Visseren, F.L.J., van Herwaarden, J.A., Nolte-’t Hoen, E.N.M., de Jager, W., Wauben, M.H.M., and Kalkhoven, E.** (2014b). Effect of extracellular vesicles of human adipose tissue on insulin signaling in liver and muscle cells. *Obesity* n/a – n/a.

**Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Pratico, D., Ratajczak, J., Vilaire, G., Kijowski, J., Reza, R., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z.** (2002). Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* 30, 450–459.

**Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Węglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., Ratajczak, M.Z., and Zembala, M.** (2005). Tumour-derived microvesicles carry several surface

determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 808–818.

**Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., et al.** (1999). PPAR $\gamma$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* 4, 597–609.

**Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet, J.M., and Martínez, M.C.** (2001). Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca $^{2+}$  entry: role of actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 276, 5134–5139.

**Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet, J.-M., and Martínez, M.C.** (2002). Loss of Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry Requires Raft Integrity ROLE OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CHANNELS AND ERK PATHWAY. *J. Biol. Chem.* 277, 19876–19881.

**Kuwabara, P.E., and Labouesse, M.** (2002). The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.* 18, 193–201.

**Kuzhandaivel, A., Schultz, S.W., Alkhorji, L., and Alenius, M.** (2014). Cilia-Mediated Hedgehog Signaling in *Drosophila*. *Cell Rep.* 7, 672–680.

**Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K.** (2007). Macrophage-Secreted Factors Impair Human Adipogenesis: Involvement of Proinflammatory State in Preadipocytes. *Endocrinology* 148, 868–877.

**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.

**Lafontan, M., and Berlan, M.** (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 276–283.

**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.

**Laviola, L., Perrini, S., Cignarelli, A., Natalicchio, A., Leonardini, A., Stefano, F.D., Cuscito, M., Fazio, M.D., Memeo, V., Neri, V., et al.** (2006). Insulin Signaling in Human Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue In Vivo. *Diabetes* 55, 952–961.

**Lay, S.L., Lefrère, I., Trautwein, C., Dugail, I., and Krief, S.** (2002). Insulin and Sterol-regulatory Element-binding Protein-1c (SREBP-1C) Regulation of Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes IDENTIFICATION OF CCAAT/ENHANCER-BINDING PROTEIN  $\beta$  AS AN SREBP-1C TARGET. *J. Biol. Chem.* 277, 35625–35634.

**Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M.C., Andriantsitohaina, R., Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M.C., and Andriantsitohaina, R.** (2014). Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View, Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxidative Med. Cell. Longev. Oxidative Med. Cell. Longev.* 2014, 2014, e908539.

**LeBrasseur, N.K., Kelly, M., Tsao, T.-S., Farmer, S.R., Saha, A.K., Ruderman, N.B., and Tomas, E.** (2006). Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 291, E175–E181.

**Lee, J., and Ozcan, U.** (2014). Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases. *J. Biol. Chem.* 289, 1203–1211.

**Lee, H.-J., Jo, S.-B., Romer, A.I., Lim, H.-J., Kim, M.-J., Koo, S.-H., Krauss, R.S., and Kang, J.-S.** (2015). Overweight in Mice and Enhanced Adipogenesis In Vitro are Associated with Lack of the Hedgehog Coreceptor Boc. *Diabetes* db141017.

**Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P., and Altaba, A.R.** (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog

that induces ventral neural tube. *Development* 124, 2537–2552.

**Lee, K., Villena, J.A., Moon, Y.S., Kim, K.-H., Lee, S., Kang, C., and Sul, H.S.** (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J. Clin. Invest.* 111, 453–461.

**Leroyer, A.S., Anfosso, F., Lacroix, R., Sabatier, F., Simoncini, S., Njock, S.M., Jourde, N., Brunet, P., Camoin-Jau, L., Sampol, J., et al.** (2010). Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis: *Thromb. Haemost.* 104, 456–463.

**Lespagnol, A., Duflaut, D., Beekman, C., Blanc, L., Fiucci, G., Marine, J.-C., Vidal, M., Amson, R., and Telerman, A.** (2008). Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ.* 15, 1723–1733.

**Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahon, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jacques, B., and McMahon, A.P.** (2001). Cholesterol Modification of Sonic Hedgehog Is Required for Long-Range Signaling Activity and Effective Modulation of Signaling by Ptc1. *Cell* 105, 599–612.

**Li, Z., Zhang, H., Denhard, L.A., Liu, L.-H., Zhou, H., and Lan, Z.-J.** (2008). Reduced white fat mass in adult mice bearing a truncated Patched 1. *Int. J. Biol. Sci.* 4, 29–36.

**Lim, G.E., Albrecht, T., Piske, M., Sarai, K., Lee, J.T.C., Ramshaw, H.S., Sinha, S., Guthridge, M.A., Acker-Palmer, A., Lopez, A.F., et al.** (2015). 14-3-3 $\zeta$  coordinates adipogenesis of visceral fat. *Nat. Commun.* 6.

**Long, J., Tokhunts, R., Old, W.M., Houel, S., Rodriguez-Blanco, J., Singh, S., Schilling, N., Capobianco, A.J., Ahn, N.G., and Robbins, D.J.** (2015). Identification of a Family of Fatty-Acid-Speciatiated Sonic Hedgehog Proteins, Whose Members Display Differential Biological Properties. *Cell Rep.* 10, 1280–1287.

**Lötvall, J., Rajendran, L., Gho, Y.-S., Thery, C., Wauben, M., Raposo, G., Sjöstrand, M., Taylor, D., Telemo, E., and Breakefield, X.O.** (2012). The launch of Journal of Extracellular Vesicles (JEV), the official journal of the International Society for Extracellular Vesicles – about microvesicles, exosomes, ectosomes and other extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 1.

**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 Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3.

**Lu, X., Liu, S., and Kornberg, T.B.** (2006). The C-terminal tail of the Hedgehog receptor Patched regulates both localization and turnover. *Genes Dev.* 20, 2539–2551.

**Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R.** (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175–184.

**MacDougald, O.A., Cornelius, P., Lin, F.T., Chen, S.S., and Lane, M.D.** (1994). Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 269, 19041–19047.

**Mackie, A.R., Klyachko, E., Thorne, T., Schultz, K.M., Millay, M., Ito, A., Kamide, C.E., Liu, T., Gupta, R., Sahoo, S., et al.** (2012). Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ. Res.* 111, 312–321.

**Madsen, L., and Kristiansen, K.** (2010). The importance of dietary modulation of cAMP and insulin signaling in adipose tissue and the development of obesity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1190, 1–14.

**Di Magliano, M.P., and Hebrok, M.** (2003). Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat. Rev. Cancer* 3, 903–911.

**Makino, S., Masuya, H., Ishijima, J., Yada, Y., and Shiroishi, T.** (2001). A Spontaneous Mouse

Mutation, mesenchymal dysplasia (mes), Is Caused by a Deletion of the Most C-Terminal Cytoplasmic Domain of patched (ptc). *Dev. Biol.* 239, 95–106.

**Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Lesèche, G., Freyssinet, J.-M., and Tedgui, A.** (1999). Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in Human Atherosclerotic Plaques A Role for Apoptosis in Plaque Thrombogenicity. *Circulation* 99, 348–353.

**Mandrup, S., Loftus, T.M., MacDougald, O.A., Kuhajda, F.P., and Lane, M.D.** (1997). Obese gene expression in in vivo levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4300.

**Mao, H., Diehl, A.M., and Li, Y.-X.** (2009). Sonic hedgehog ligand partners with caveolin-1 for intracellular transport. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 89, 290–300.

**Marigo, V., and Tabin, C.J.** (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9346–9351.

**Marigo, V., Roberts, D.J., Lee, S.M.K., Tsukurov, O., Levi, T., Gastier, J.M., Epstein, D.J., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Seidman, C.E., et al.** (1995). Cloning, Expression, and Chromosomal Location of SHH and IHH: Two Human Homologues of the Drosophila Segment Polarity Gene Hedgehog. *Genomics* 28, 44–51.

**Marion, V., Stoetzel, C., Schlicht, D., Messaddeq, N., Koch, M., Flori, E., Danse, J.M., Mandel, J.-L., and Dollfus, H.** (2009). Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1820–1825.

**Marion, V., Mockel, A., De Melo, C., Obringer, C., Claussmann, A., Simon, A., Messaddeq, N., Durand, M., Dupuis, L., Loeffler, J.-P., et al.** (2012). BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. *Cell Metab.* 16, 363–377.

**Martin, P.L., Lane, J., Pouliot, L., Gains, M., Stejskal, R., Smith, S.Y., Galdes, A., and Green, J.** (2002). Increases in adipose and total body weight, but not in lean body mass, associated with subcutaneous administration of Sonic hedgehog-Ig fusion protein to mice. *Drug Dev. Res.* 57, 107–114.

**Martinez, M.C., and Andriantsitohaina, R.** (2011). Microparticles in Angiogenesis Therapeutic Potential. *Circ. Res.* 109, 110–119.

**Martínez, M.C., Martin, S., Toti, F., Fressinaud, E., Dachary-Prigent, J., Meyer, D., and Freyssinet, J.-M.** (1999). Significance of Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry in the Regulation of Phosphatidylserine Expression at the Surface of Stimulated Cells. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 10092–10098.

**Martínez, M.C., Larbret, F., Zobairi, F., Coulombe, J., Debili, N., Vainchenker, W., Ruat, M., and Freyssinet, J.-M.** (2006). Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 108, 3012–3020.

**Martinez, M.C., Tual-Chalot, S., Leonetti, D., and Andriantsitohaina, R.** (2011). Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 659–665.

**Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E., and Simpson, R.J.** (2012). ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 40, D1241–D1244.

**Matusek, T., Wendler, F., Polès, S., Pizette, S., D'Angelo, G., Fürthauer, M., and Théron, P.P.** (2014). The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature* 516, 99–103.

**Maun, H.R., Wen, X., Lingel, A., Sauvage, F.J. de, Lazarus, R.A., Scales, S.J., and Hymowitz, S.G.** (2010). Hedgehog Pathway Antagonist 5E1 Binds Hedgehog at the Pseudo-active Site. *J. Biol. Chem.* 285, 26570–26580.

**McCarthy, R.A., Barth, J.L., Chintalapudi, M.R., Knaak, C., and Argraves, W.S.** (2002).

Megalin Functions as an Endocytic Sonic Hedgehog Receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 25660–25667.

**McLellan, J.S., Zheng, X., Hauk, G., Ghirlando, R., Beachy, P.A., and Leahy, D.J.** (2008). The mode of Hedgehog binding to Ihog homologs is not conserved across different phyla. *Nature* 455, 979–983.

**McMahon, A.P.** (2000). More Surprises in the Hedgehog Signaling Pathway. *Cell* 100, 185–188.

**McMahon, A.P., Ingham, P.W., and Tabin, C.J.** (2003). Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Academic Press), pp. 1–114.

**Meloni, A.R., Fralish, G.B., Kelly, P., Salahpour, A., Chen, J.K., Wechsler-Reya, R.J., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G.** (2006). Smoothed Signal Transduction Is Promoted by G Protein-Coupled Receptor Kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7550–7560.

**Milenkovic, L., Scott, M.P., and Rohatgi, R.** (2009). Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J. Cell Biol.* 187, 365–374.

**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.

**Möbius, W., Van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F.G., Slot, J.W., and Geuze, H.J.** (2003). Recycling Compartments and the Internal Vesicles of Multivesicular Bodies Harbor Most of the Cholesterol Found in the Endocytic Pathway. *Traffic* 4, 222–231.

**Morel, O., Toti, F., Hugel, B., Bakouboula, B., Camoin-Jau, L., Dignat-George, F., and Freyssinet, J.-M.** (2006). Procoagulant Microparticles Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2594–2604.

**Morel, O., Morel, N., Jesel, L., Freyssinet, J.-M., and Toti, F.** (2011). Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin. Immunopathol.* 33, 469–486.

**Morelli, A.E.** (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266.

**Mosser, D.M.** (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209–212.

Muenke, M., and Beachy, P.A. (2000). Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 262–269.

**Ann Mulcahy, L., Charles Pink, R., and Raul Francisco Carter, D.** (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* 3.

**Müller, G., Jung, C., Straub, J., Wied, S., and Kramer, W.** (2009). Induced release of membrane vesicles from rat adipocytes containing glycosylphosphatidylinositol-anchored microdomain and lipid droplet signalling proteins. *Cell. Signal.* 21, 324–338.

**Muntasell, A., Berger, A.C., and Roche, P.A.** (2007). T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J.* 26, 4263–4272.

**Murakami, T., Horigome, H., Tanaka, K., Nakata, Y., Ohkawara, K., Katayama, Y., and Matsui, A.** (2007). Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thromb. Res.* 119, 45–53.

**Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., and D'Souza-Schorey, C.** (2009). ARF6-regulated shedding of tumor-cell derived plasma membrane microvesicles. *Curr. Biol. CB* 19, 1875–1885.

**Nachtergaele, S., Mydock, L.K., Krishnan, K., Rammohan, J., Schlesinger, P.H., Covey, D.F., and Rohatgi, R.** (2012). Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nat. Chem. Biol.* 8, 211–220.

**Nachtergaele, S., Whalen, D.M., Mydock, L.K., Zhao, Z., Malinauskas, T., Krishnan, K.,**



- Ingham, P.W., Covey, D.F., Siebold, C., and Rohatgi, R.** (2013). Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *eLife* 2, e01340.
- Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C., et al.** (2007). A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell* 129, 1201–1213.
- Nakamura, T., Aikawa, T., Iwamoto-Enomoto, M., Iwamoto, M., Higuchi, Y., Maurizio, P., Kinto, N., Yamaguchi, A., Noji, S., Kurisu, K., et al.** (1997). Induction of Osteogenic Differentiation by Hedgehog Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 465–469.
- 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.
- Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., and Salic, A.** (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat. Chem. Biol.* 9, 557–564.
- 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.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al.** (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 15, 914–920.
- 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.
- Nomura, S., Suzuki, M., Katsura, K., Xie, G.L., Miyazaki, Y., Miyake, T., Kido, H., Kagawa, H., and Fukuhara, S.** (1995). Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 116, 235–240.
- Nosavanh, L., Yu, D.-H., Jaehrig, E.J., Tong, Q., Shen, L., and Chen, M.-H.** (2015). Cell-autonomous activation of Hedgehog signaling inhibits brown adipose tissue development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5069–5074.
- Nuschke, A., Rodrigues, M., Stolz, D.B., Chu, C.T., Griffith, L., and Wells, A.** (2014). Human mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells consume accumulated autophagosomes early in differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* 5.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801.
- Ogawa, R., Tanaka, C., Sato, M., Nagasaki, H., Sugimura, K., Okumura, K., Nakagawa, Y., and Aoki, N.** (2010). Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 723–729.
- Oliveira, F. s., Bellesini, L. s., Defino, H. I. a., da Silva Herrero, C. f., Beloti, M. m., and Rosa, A. I.** (2012). Hedgehog signaling and osteoblast gene expression are regulated by purmorphamine in human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 113, 204–208.
- Outram, S.V., Varas, A., Pepicelli, C.V., and Crompton, T.** (2000). Hedgehog Signaling Regulates Differentiation from Double-Negative to Double-Positive Thymocyte. *Immunity* 13, 187–197.
- Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S.** (2004). Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 306, 457–461.
- Palladino, M., Gatto, I., Neri, V., Straino, S., Silver, M., Tritarelli, A., Piccioni, A., Smith,**

- R.C., Gaetani, E., Losordo, D.W., et al.** (2011). Pleiotropic Beneficial Effects of Sonic Hedgehog Gene Therapy in an Experimental Model of Peripheral Limb Ischemia. *Mol. Ther.* *19*, 658–666.
- Palm, W., Swierczynska, M.M., Kumari, V., Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S.R., and Eaton, S.** (2013). Secretion and Signaling Activities of Lipoprotein-Associated Hedgehog and Non-Sterol-Modified Hedgehog in Flies and Mammals. *PLoS Biol* *11*, e1001505.
- Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Díaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B.H., Satir, P., and Cuervo, A.M.** (2013). Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* *502*, 194–200.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M.** (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* *101*, 942–948.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., and Wang, B.** (2006). Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 3365–3377.
- Pan, Y., Wang, C., and Wang, B.** (2009). Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev. Biol.* *326*, 177–189.
- Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., and Eaton, S.** (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* *435*, 58–65.
- Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D.P., Garber, E.A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Tabin, C.J., Blake Pepinsky, R., and Williams, K.P.** (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech. Dev.* *106*, 107–117.
- Paulis, L., Fauconnier, J., Cazorla, O., Thireau, J., Soleti, R., Vidal, B., Ouillé, A., Bartholome, M., Bideaux, P., Roubille, F., et al.** (2015). Activation of Sonic hedgehog signaling in ventricular cardiomyocytes exerts cardioprotection against ischemia reperfusion injuries. *Sci. Rep.* *5*.
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., et al.** (1998). Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* *273*, 14037–14045.
- Phoonsawat, W., Aoki-Yoshida, A., Tsuruta, T., and Sonoyama, K.** (2014). Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *448*, 261–266.
- Plaisant, M., Fontaine, C., Cousin, W., Rochet, N., Dani, C., and Peraldi, P.** (2009). Activation of Hedgehog Signaling Inhibits Osteoblast Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* *27*, 703–713.
- Poissonnet, C.M., Burdi, A.R., and Garn, S.M.** (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum. Dev.* *10*, 1–11.
- Polizio, A.H., Chinchilla, P., Chen, X., Manning, D.R., and Riobo, N.A.** (2011). Sonic Hedgehog Activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-Independent Manner Through Coupling of Smoothed to Gi Proteins. *Sci. Signal.* *4*, pt7.
- Poole, C.A., Jensen, C.G., Snyder, J.A., Gray, C.G., Hermanutz, V.L., and Wheatley, D.N.** (1997). Confocal Analysis of Primary Cilia Structure and Colocalization with the Golgi Apparatus in Chondrocytes and Aortic Smooth Muscle Cells. *Cell Biol. Int.* *21*, 483–494.
- Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A.** (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* *274*, 255–259.
- Pospisilik, J.A., Schramek, D., Schnidar, H., Cronin, S.J.F., Nehme, N.T., Zhang, X., Knauf, C., Cani, P.D., Aumayr, K., Todoric, J., et al.** (2010). Drosophila Genome-wide Obesity Screen Reveals Hedgehog as a Determinant of Brown versus White Adipose Cell Fate. *Cell* *140*, 148–160.

- Price, M.A., and Kalderon, D.** (2002). Proteolysis of the Hedgehog Signaling Effector Cubitus interruptus Requires Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* *108*, 823–835.
- Priou, P., Gagnadoux, F., Tesse, A., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Meslier, N., Racineux, J.-L., Martinez, M.C., Trzepizur, W., and Andriantsitohaina, R.** (2010). Endothelial Dysfunction and Circulating Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Pathol.* *177*, 974–983.
- Qiang, L., Wang, H., and Farmer, S.R.** (2007). Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 4698–4707.
- Rahmouni, K., Fath, M.A., Seo, S., Thedens, D.R., Berry, C.J., Weiss, R., Nishimura, D.Y., and Sheffield, V.C.** (2008). Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. *J. Clin. Invest.* *118*, 1458–1467.
- Rana, R., Carroll, C.E., Lee, H.-J., Bao, J., Marada, S., Grace, C.R.R., Guibao, C.D., Ogden, S.K., and Zheng, J.J.** (2013). Structural insights into the role of the Smoothed cysteine-rich domain in Hedgehog signalling. *Nat. Commun.* *4*, 2965.
- 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.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., and Ratajczak, M.Z.** (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* *20*, 847–856.
- Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V.** (2007). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int. J. Obes.* *32*, 451–463.
- Rautou, P.-E., Leroyer, A.S., Ramkhalawon, B., Devue, C., Duflaut, D., Vion, A.-C., Nalbone, G., Castier, Y., Leseche, G., Lehoux, S., et al.** (2011). Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1-Dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration. *Circ. Res.* *108*, 335–343.
- Regazzetti, C., Peraldi, P., Grémeaux, T., Najem-Lendom, R., Ben-Sahra, I., Cormont, M., Bost, F., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.-F., and Giorgetti-Peraldi, S.** (2009). Hypoxia Decreases Insulin Signaling Pathways in Adipocytes. *Diabetes* *58*, 95–103.
- Renault, M.-A., Roncalli, J., Tongers, J., Thorne, T., Klyachko, E., Misener, S., Volpert, O.V., Mehta, S., Burg, A., Luedemann, C., et al.** (2010). Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 490–498.
- Renault, M.-A., Chapouly, C., Yao, Q., Larrieu-Lahargue, F., Vandierdonck, S., Reynaud, A., Petit, M., Jaspard-Vinassa, B., Belloc, I., Traiffort, E., et al.** (2013). Desert Hedgehog Promotes Ischemia-Induced Angiogenesis by Ensuring Peripheral Nerve Survival. *Circ. Res.* *112*, 762–770.
- Ricquier, D.** (2013). Tissu adipeux brun: fonction et développement. In *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux*, (Springer Paris), pp. 53–68.
- Riobo, N.A., Saucy, B., DiLizio, C., and Manning, D.R.** (2006). Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 12607–12612.
- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E.-Z., Dani, C., et al.** (2004). Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 255–263.

- Rodríguez-Suárez, E., Gonzalez, E., Hughes, C., Conde-Vancells, J., Rudella, A., Royo, F., Palomo, L., Elortza, F., Lu, S.C., Mato, J.M., et al.** (2014). Quantitative proteomic analysis of hepatocyte-secreted extracellular vesicles reveals candidate markers for liver toxicity. *J. Proteomics* *103*, 227–240.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M.P.** (2007). Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science* *317*, 372–376.
- Romano, S., Milan, G., Veronese, C., Collin, G.B., Marshall, J.D., Centobene, C., Favaretto, F., Dal Pra, C., Scarda, A., Leandri, S., et al.** (2008). Regulation of Alström syndrome gene expression during adipogenesis and its relationship with fat cell insulin sensitivity. *Int. J. Mol. Med.* *21*, 731–736.
- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A.** (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 885–896.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M.** (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* *4*, 611–617.
- Rozmyslowicz, T., Majka, M., Kijowski, J., Murphy, S.L., Conover, D.O., Poncz, M., Ratajczak, J., Gaulton, G.N., and Ratajczak, M.Z.** (2003). Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids* *17*, 33–42.
- Ruat, M., Hoch, L., Faure, H., and Rognan, D.** (2014). Targeting of Smoothed for therapeutic gain. *Trends Pharmacol. Sci.* *35*, 237–246.
- Ruiz-Perez, V.L., Ide, S.E., Strom, T.M., Lorenz, B., Wilson, D., Woods, K., King, L., Francomano, C., Freisinger, P., Spranger, S., et al.** (2000). Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodistal dysostosis. *Nat. Genet.* *24*, 283–286.
- Sabatier, F., Darmon, P., Hugel, B., Combes, V., Sanmarco, M., Velut, J.-G., Arnoux, D., Charpiot, P., Freyssinet, J.-M., Oliver, C., et al.** (2002). Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles. *Diabetes* *51*, 2840–2845.
- Del Sal, G., Ruaro, M.E., Philipson, L., and Schneider, C.** (1992). The growth arrest-specific gene, *gas1*, is involved in growth suppression. *Cell* *70*, 595–607.
- Sano, S., Izumi, Y., Yamaguchi, T., Yamazaki, T., Tanaka, M., Shiota, M., Osada-Oka, M., Nakamura, Y., Wei, M., Wanibuchi, H., et al.** (2014). Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *445*, 327–333.
- Sapet, C., Simoncini, S., Loriol, B., Puthier, D., Sampol, J., Nguyen, C., Dignat-George, F., and Anfosso, F.** (2006). Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* *108*, 1868–1876.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H.** (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* *126*, 3915–3924.
- 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.
- Scales, S.J., and de Sauvage, F.J.** (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* *30*, 303–312.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Chin, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al.** (2008). PRDM16 Controls a Brown Fat/Skeletal Muscle Switch. *Nature* *454*, 961–967.
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., and Bréard, J.** (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* *3*, 346–352.

- Sekulic, A., Migden, M.R., Oro, A.E., Dirix, L., Lewis, K.D., Hainsworth, J.D., Solomon, J.A., Yoo, S., Arron, S.T., Friedlander, P.A., et al.** (2012). Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 366, 2171–2179.
- Seo, S., Guo, D.-F., Bugge, K., Morgan, D.A., Rahmouni, K., and Sheffield, V.C.** (2009). Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1323–1331.
- Shi, D., Lv, X., Zhang, Z., Yang, X., Zhou, Z., Zhang, L., and Zhao, Y.** (2013). Smoothed Oligomerization/Higher Order Clustering in Lipid Rafts Is Essential for High Hedgehog Activity Transduction. *J. Biol. Chem.* 288, 12605–12614.
- Šimák, J., Holada, K., and Vostal, J.G.** (2002). Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol.* 3, 11.
- Simons, K., and Gerl, M.J.** (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 688–699.
- Singh, R., Xiang, Y., Wang, Y., Baikati, K., Cuervo, A.M., Luu, Y.K., Tang, Y., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., and Czaja, M.J.** (2009). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.*
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., 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.
- Slawik, M., and Vidal-Puig, A.J.** (2007). Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr.* 2, 41–45.
- Smalley, D.M., and Ley, K.** (2008). Plasma-derived microparticles for biomarker discovery. *Clin. Lab.* 54, 67–79.
- Smas, C.M., Chen, L., Zhao, L., Latasa, M.-J., and Sul, H.S.** (1999). Transcriptional Repression of pref-1 by Glucocorticoids Promotes 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* 274, 12632–12641.
- Smelkinson, M.G., and Kalderon, D.** (2006). Processing of the Drosophila Hedgehog Signaling Effector Ci-155 to the Repressor Ci-75 Is Mediated by Direct Binding to the SCF Component Slimb. *Curr. Biol.* 16, 110–116.
- Sokolova, V., Ludwig, A.-K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P.A., Epple, M., and Giebel, B.** (2011). Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 87, 146–150.
- Soleti, R., Benameur, T., Porro, C., Panaro, M.A., Andriantsitohaina, R., and Martínez, M.C.** (2009). Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30, 580–588.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al.** (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.
- Spiegelman, B.M.** (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47, 507–514.
- Spinella-Jaegle, S., Rawadi, G., Kawai, S., Gallea, S., Faucheu, C., Mollat, P., Courtois, B., Bergaud, B., Ramez, V., Blanchet, A.M., et al.** (2001). Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J. Cell Sci.* 114, 2085–2094.
- Sprague, D.L., Elzey, B.D., Crist, S.A., Waldschmidt, T.J., Jensen, R.J., and Ratliff, T.L.**

(2008). Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* *111*, 5028–5036.

**Stepanian, A., Bourguignat, L., Hennou, S., Coupaye, M., Hajage, D., Salomon, L., Alessi, M.-C., Msika, S., and de Prost, D.** (2013). Microparticle increase in severe obesity: Not related to metabolic syndrome and unchanged after massive weight loss. *Obesity* *21*, 2236–2243.

**Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A.M., and Ingham, P.W.** (2001). Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr. Biol.* *11*, 608–613.

**Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A.** (2009). Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* *10*, 925–937.

**Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M.** (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* *89*, 205–212.

**Suh, J.M., Gao, X., McKay, J., McKay, R., Salo, Z., and Graff, J.M.** (2006). Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation. *Cell Metab.* *3*, 25–34.

**Sul, H.S.** (2009). Minireview: Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate. *Mol. Endocrinol.* *23*, 1717–1725.

**Sul, H.S., Smas, C., Mei, B., and Zhou, L.** (2000). Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *24 Suppl 4*, S15–S19.  
Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., and Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* *468*, 834–838.

**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.

**Taipale, J., Chen, J.K., Cooper, M.K., Wang, B., Mann, R.K., Milenkovic, L., Scott, M.P., and Beachy, P.A.** (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* *406*, 1005–1009.

**Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A.** (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* *418*, 892–896.

**Tan, K.T., Tayebjee, M.H., Lim, H.S., and Lip, G.Y.H.** (2005). Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *22*, 1657–1662.

**Tanaka, M., Nozaki, M., Fukuhara, A., Segawa, K., Aoki, N., Matsuda, M., Komuro, R., and Shimomura, I.** (2007). Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *359*, 194–201.

**Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S.** (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* *16*, 7432–7443.

**Tanaka, Y., Okada, Y., and Hirokawa, N.** (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left–right determination. *Nature* *435*, 172–177.

Tang, Q.Q., and Lane, M.D. (2012). Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 715–736.

**Tang, J.Y., Mackay-Wiggan, J.M., Aszterbaum, M., Yauch, R.L., Lindgren, J., Chang, K., Coppola, C., Chanana, A.M., Marji, J., Bickers, D.R., et al.** (2012). Inhibiting the Hedgehog Pathway in Patients with the Basal-Cell Nevus Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2180–2188.

**Taylor, S.M., and Jones, P.A.** (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T12 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* *17*, 771–779.

- Taylor, D.D., Chou, I.-N., and Black, P.H.** (1983). Isolation of plasma membrane fragments from cultured murine melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *113*, 470–476.
- Tchernof, A., Bélanger, C., Morisset, A.-S., Richard, C., Mailloux, J., Laberge, P., and Dupont, P.** (2006). Regional Differences in Adipose Tissue Metabolism in Women Minor Effect of Obesity and Body Fat Distribution. *Diabetes* *55*, 1353–1360.
- Tempé, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M.-F., and Concordet, J.-P.** (2006). Multisite Protein Kinase A and Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Phosphorylation Leads to Gli3 Ubiquitination by SCF $\beta$ TrCP. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 4316–4326.
- Tenzen, T., Allen, B.L., Cole, F., Kang, J.-S., Krauss, R.S., and McMahon, A.P.** (2006). The Cell Surface Membrane Proteins Cdo and Boc Are Components and Targets of the Hedgehog Signaling Pathway and Feedback Network in Mice. *Dev. Cell* *10*, 647–656.
- Teperino, R., Amann, S., Bayer, M., McGee, S.L., Loipetzberger, A., Connor, T., Jaeger, C., Kammerer, B., Winter, L., Wiche, G., et al.** (2012). Hedgehog Partial Agonism Drives Warburg-like Metabolism in Muscle and Brown Fat. *Cell* *151*, 414–426.
- Tesse, A., Martínez, M.C., Hugel, B., Chalupsky, K., Muller, C.D., Meziani, F., Mitolo-Chieppa, D., Freyssinet, J.-M., and Andriantsitohaina, R.** (2005). Upregulation of Proinflammatory Proteins Through NF- $\kappa$ B Pathway by Shed Membrane Microparticles Results in Vascular Hyporeactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 2522–2527.
- Tetta, C., Bruno, S., Fonsato, V., Deregibus, M.C., and Camussi, G.** (2011). The role of microvesicles in tissue repair. *Organogenesis* *7*, 105–115.
- The, I., Bellaïche, Y., and Perrimon, N.** (1999). Hedgehog Movement Is Regulated through tout velu-Dependent Synthesis of a Heparan Sulfate Proteoglycan. *Mol. Cell* *4*, 633–639.
- The Gene Ontology Consortium, T.G.O.** (2001). Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation. *Genome Res.* *11*, 1425–1433.
- Thérond, P.P.** (2012). Release and transportation of Hedgehog molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 173–180.
- Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S.** (1999). Molecular Characterization of Dendritic Cell-Derived Exosomes. *J. Cell Biol.* *147*, 599–610.
- Théry, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S.** (2001a). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J. Immunol.* *166*, 7309–7318.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A.** (2001). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. In *Current Protocols in Cell Biology*, (John Wiley & Sons, Inc.).
- Théry, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S.** (2001b). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J. Immunol.* *166*, 7309–7318.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E.** (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 581–593.
- Todoric, J., Strobl, B., Jais, A., Boucheron, N., Bayer, M., Amann, S., Lindroos, J., Teperino, R., Prager, G., Bilban, M., et al.** (2011). Cross-Talk Between Interferon- and Hedgehog Signaling Regulates Adipogenesis. *Diabetes* *60*, 1668–1676.
- Tong, Q., Tsai, J., Tan, G., Dalgin, G., and Hotamisligil, G.S.** (2005). Interaction between GATA and the C/EBP Family of Transcription Factors Is Critical in GATA-Mediated Suppression of Adipocyte Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 706–715.
- Tordjman, J.** (2013). *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* | Springer (Bastard, Jean-

Philippe and Fève, Bruno).

**Torroja, C., Gorfinkiel, N., and Guerrero, I.** (2004). Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* *131*, 2395–2408.

**Toti, F., Satta, N., Fressinaud, E., Meyer, D., and Freyssinet, J.M.** (1996). Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* *87*, 1409–1415.

**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.

**Tramontano, A.F., O’Leary, J., Black, A.D., Muniyappa, R., Cutaia, M.V., and El-Sherif, N.** (2004). Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *320*, 34–38.

**Tramontano, A.F., Lyubarova, R., Tsiakos, J., Palaia, T., DeLeon, J.R., and Ragolia, L.** (2010). Circulating Endothelial Microparticles in Diabetes Mellitus. *Mediators Inflamm.* *2010*.

**Tukachinsky, H., Lopez, L.V., and Salic, A.** (2010). A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *J. Cell Biol.* *191*, 415–428.

**Tukachinsky, H., Kuzmickas, R.P., Jao, C.Y., Liu, J., and Salic, A.** (2012). Dispatched and Scube Mediate the Efficient Secretion of the Cholesterol-Modified Hedgehog Ligand. *Cell Rep.* *2*, 308–320.

**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.

**Vidal, M.J., and Stahl, P.D.** (1993). The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation. *Eur. J. Cell Biol.* *60*, 261–267.

**Villageois, P., Wdziekonski, B., Zaragosi, L.-E., Plaisant, M., Mohsen-Kanson, T., Lay, N., Ladoux, A., Peraldi, P., and Dani, C.** (2011). Regulators of human adipose-derived stem cell self-renewal. *Am. J. Stem Cells* *1*, 42–47.

**Vince, R.V., Christmas, B., Midgley, A.W., McNaughton, L.R., and Madden, L.A.** (2009). Hypoxia mediated release of endothelial microparticles and increased association of S100A12 with circulating neutrophils. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2*, 2–6.

**Vion, A.-C., Ramkhalawon, B., Loyer, X., Chironi, G., Devue, C., Loirand, G., Tedgui, A., Lehoux, S., and Boulanger, C.M.** (2013). Shear Stress Regulates Endothelial Microparticle Release. *Circ. Res.* *112*, 1323–1333.

**Virtanen, K.A., Lönnroth, P., Parkkola, R., Peltoniemi, P., Asola, M., Viljanen, T., Tolvanen, T., Knuuti, J., Rönnemaa, T., Huupponen, R., et al.** (2002). Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 3902–3910.

**Van der Vlist, E.J., Nolte-’t Hoen, E.N.M., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G.J.A., and Wauben, M.H.M.** (2012). Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat. Protoc.* *7*, 1311–1326.

**Vokes, S.A., Ji, H., Wong, W.H., and McMahon, A.P.** (2008). A genome-scale analysis of the cis-regulatory circuitry underlying sonic hedgehog-mediated patterning of the mammalian limb. *Genes Dev.* *22*, 2651–2663.

**Vyas, N., Goswami, D., Manonmani, A., Sharma, P., Ranganath, H.A., VijayRaghavan, K., Shashidhara, L.S., Sowdhamini, R., and Mayor, S.** (2008). Nanoscale Organization of Hedgehog Is Essential for Long-Range Signaling. *Cell* *133*, 1214–1227.



- Vyas, N., Walvekar, A., Tate, D., Lakshmanan, V., Bansal, D., Cicero, A.L., Raposo, G., Palakodeti, D., and Dhawan, J.** (2014). Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties. *Sci. Rep.* *4*.
- Wältermann, M., and Steinbüchel, A.** (2005). Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots. *J. Bacteriol.* *187*, 3607–3619.
- Wang, C., Wu, H., Evron, T., Vardy, E., Han, G.W., Huang, X.-P., Hufeisen, S.J., Mangano, T.J., Urban, D.J., Katritch, V., et al.** (2014). Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anti-cancer drugs. *Nat. Commun.* *5*, 4355.
- Wang, J.-G., Williams, J.C., Davis, B.K., Jacobson, K., Doerschuk, C.M., Ting, J.P.-Y., and Mackman, N.** (2011). Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 $\beta$ -dependent manner. *Blood* *118*, 2366–2374.
- Wang, Y., Zhou, Z., Walsh, C.T., and McMahon, A.P.** (2009). Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2623–2628.
- Wang, Y., Arvanites, A.C., Davidow, L., Blanchard, J., Lam, K., Yoo, J.W., Coy, S., Rubin, L.L., and McMahon, A.P.** (2012a). Selective identification of hedgehog pathway antagonists by direct analysis of smoothed ciliary translocation. *ACS Chem. Biol.* *7*, 1040–1048.
- Wang, Y., Davidow, L., Arvanites, A.C., Blanchard, J., Lam, K., Xu, K., Oza, V., Yoo, J.W., Ng, J.M.Y., Curran, T., et al.** (2012b). Glucocorticoid Compounds Modify Smoothed Localization and Hedgehog Pathway Activity. *Chem. Biol.* *19*, 972–982.
- Wang, Z.V., Schraw, T.D., Kim, J.-Y., Khan, T., Rajala, M.W., Follenzi, A., and Scherer, P.E.** (2007). Secretion of the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin Critically Depends on Thiol-Mediated Protein Retention. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3716–3731.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W.** (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *112*, 1796–1808.
- Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W.** (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* *116*, 115–124.
- Wilson, C.W., Chen, M.-H., and Chuang, P.-T.** (2009). Smoothed Adopts Multiple Active and Inactive Conformations Capable of Trafficking to the Primary Cilium. *PLoS ONE* *4*, e5182.
- Wiper-Bergeron, N., Salem, H.A., Tomlinson, J.J., Wu, D., and Haché, R.J.G.** (2007). Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBP $\beta$  by GCN5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 2703–2708.
- Witek, R.P., Yang, L., Liu, R., Jung, Y., Omenetti, A., Syn, W.-K., Choi, S.S., Cheong, Y., Fearing, C.M., Agboola, K.M., et al.** (2009). Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology* *136*, 320–330.e2.
- Wolf, P.** (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br. J. Haematol.* *13*, 269–288.
- 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.
- Wu, J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M.** (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes Dev.* *27*, 234–250.
- Wu, X., Ding, S., Ding, Q., Gray, N.S., and Schultz, P.G.** (2002). A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 14520–14521.

- 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.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al.** (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.
- Yang, C., Mwaikambo, B.R., Zhu, T., Gagnon, C., Lafleur, J., Seshadri, S., Lachapelle, P., Lavoie, J.-C., Chemtob, S., and Hardy, P.** (2008). Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R467–R476.
- Yang, C., Gagnon, C., Hou, X., and Hardy, P.** (2010). Low density lipoprotein receptor mediates anti-VEGF effect of lymphocyte T-derived microparticles in Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 10, 448–456.
- Yang, W., Thein, S., Wang, X., Bi, X., Ericksen, R.E., Xu, F., and Han, W.** (2014). BSCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodelling. *Hum. Mol. Genet.* 23, 502–513.
- Yao, Q., Renault, M.-A., Chapouly, C., Vandierdonck, S., Belloc, I., Jaspard-Vinassa, B., Daniel-Lamazière, J.-M., Laffargue, M., Merched, A., Desgranges, C., et al.** (2014). Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation. *Blood* 123, 2429–2437.
- Yavari, A., Nagaraj, R., Owusu-Ansah, E., Folick, A., Ngo, K., Hillman, T., Call, G., Rohatgi, R., Scott, M.P., and Banerjee, U.** (2010). Role of Lipid Metabolism in Smoothed Derepression in Hedgehog Signaling. *Dev. Cell* 19, 54–65.
- Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q.** (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293, E1118–E1128.
- Yin, J., Gao, Z., He, Q., Zhou, D., Guo, Z., and Ye, J.** (2009). Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 296, E333–E342.
- Young, S.G., Davies, B.S.J., Voss, C.V., Gin, P., Weinstein, M.M., Tontonoz, P., Reue, K., Bensadoun, A., Fong, L.G., and Beigneux, A.P.** (2011). GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.* 52, 1869–1884.
- Yu, X., Harris, S.L., and Levine, A.J.** (2006). The Regulation of Exosome Secretion: a Novel Function of the p53 Protein. *Cancer Res.* 66, 4795–4801.
- Zaragosi, L.-E., Ailhaud, G., and Dani, C.** (2006). Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is Critical for Self-Renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *STEM CELLS* 24, 2412–2419.
- Zaragosi, L.-E., Wdziekonski, B., Villageois, P., Keophiphath, M., Maumus, M., Tchkonja, T., Bourlier, V., Mohsen-Kanson, T., Ladoux, A., Elabd, C., et al.** (2010). Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 59, 2513–2521.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., and Madeo, F.** (2012). FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell Metab.* 15, 279–291.
- Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J., Schreiner, C.M., and Robbins, D.J.** (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716–720.
- Zhang, H.-G., and Grizzle, W.E.** (2011). Exosomes and cancer: a newly described pathway of

immune suppression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 959–964.

**Zhang, L., Chen, X.-M., Sun, Z.-J., Bian, Z., Fan, M.-W., and Chen, Z.** (2006). Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. *Oral Oncol.* 42, 398–408.

**Zhang, Q., Seo, S., Bugge, K., Stone, E.M., and Sheffield, V.C.** (2012). BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1945–1953.

**Zhang, X., McGeoch, S.C., Johnstone, A.M., Holtrop, G., Sneddon, A.A., MacRury, S.M., Megson, I.L., Pearson, D.W.M., Abraham, P., De Roos, B., et al.** (2014). Platelet-derived microparticle count and surface molecule expression differ between subjects with and without type 2 diabetes, independently of obesity status. *J. Thromb. Thrombolysis* 37, 455–463.

**Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J.G., Luhm, R.A., Wiedmer, T., and Sims, P.J.** (1997). Molecular Cloning of Human Plasma Membrane Phospholipid Scramblase A PROTEIN MEDIATING TRANSBILAYER MOVEMENT OF PLASMA MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS. *J. Biol. Chem.* 272, 18240–18244.

**Zhu, D., Shi, S., Wang, H., and Liao, K.** (2009). Growth arrest induces primary-cilium formation and sensitizes IGF-1-receptor signaling during differentiation induction of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Sci.* 122, 2760–2768.

**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.

**Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H.** (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

**Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H.** (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.

**Zwaal, R.F.A., and Schroit, A.J.** (1997). Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* 89, 1121–1132.

## **Annexes**



**Annexe 1** : Liste des protéines identifiées dans les VE adipocytaires par spectrométrie de masse.

Quatre échantillons indépendants ont été analysés pour chaque type de VE : les VE totales, les MP et les exosomes. Les valeurs représentent le nombre de spectres obtenus dans chaque type de VE. Acc N° : numéro d'accèsion des protéines dans la base de données Uniprot.

Acc N°	Gene name	Protein description	SUM			total EV				Exosomes				MP			
			EV	EXO	MP	EV1	EV2	EV3	EV4	Exo1	Exo2	Exo3	Exo4	MP1	MP2	MP3	MP4
<b>Chaperones</b>																	
P07901	Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha	2	3	20	0	0	0	2	2	0	0	1	6	3	8	3
P08113	Hsp90b1	Endoplasmic	3	4	29	1	0	1	1	3	1	0	0	7	4	7	11
P11499	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	12	10	50	2	3	3	4	4	2	0	4	14	10	17	9
P11983-2	Tcp1	Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit alpha	8	7	5	0	1	3	4	2	2	1	2	1	0	2	2
P20029	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	15	6	52	3	3	5	4	3	1	1	1	14	9	16	13
P35564	Canx	Calnexin	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3
P38647	Hspa9	Stress-70 protein, mitochondrial	11	0	34	5	1	2	3	0	0	0	0	7	11	3	13
P42932	Cct8	T-complex protein 1 subunit theta	10	7	11	1	2	3	4	2	2	0	3	4	1	4	2
P61982	Ywhag	14-3-3 protein gamma	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1
P63017	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	15	9	41	5	3	3	4	3	1	1	4	11	9	15	6
P63038	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	12	0	38	5	4	3	0	0	0	0	0	9	11	5	13
P63101	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	3	0	15	0	1	1	1	0	0	0	0	5	2	4	4
P68254-2	Ywhaq	Isoform 2 of 14-3-3 protein theta	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1
P80314	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	9	16	12	3	2	2	2	6	3	4	3	3	0	8	1
P80315	Cct4	T-complex protein 1 subunit delta	6	3	5	2	0	2	2	2	0	1	0	1	1	2	1
P80316	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	2	4	4	0	0	2	0	1	0	1	2	1	0	3	0
P80317	Cct6a	T-complex protein 1 subunit zeta	0	2	9	0	0	0	0	1	0	0	1	4	0	5	0
P80318	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	7	3	10	1	1	3	2	0	2	0	1	4	1	3	2
Q61316	Hspa4	Heat shock 70 kDa protein 4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0
Q64433	Hs1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	2	0	6	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2
Q9CQN1	Trap1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	2
Q9CQV8-2	Ywhab	Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha	3	1	18	0	1	2	0	1	0	0	0	5	3	6	4
Q9JKR6	Hyou1	Hypoxia up-regulated protein 1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
<b>Cytoskeleton-related proteins</b>																	
A2AQ07	Tubb1	Tubulin beta-1 chain	4	2	7	1	0	1	2	0	0	0	2	0	0	4	3
O88342	Wdr1	WD repeat-containing protein 1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
P13020-2	Gsn	Isoform 2 of Gelsolin	4	1	39	2	1	1	0	1	0	0	0	13	7	10	9
P18760	Cfl1	Cofilin-1	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	4
P20152	Vim	Vimentin	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1
P26039	Tln1	Talin-1	2	0	9	0	2	0	0	0	0	0	0	2	1	3	3
P26041	Msn	Moesin	1	0	16	1	0	0	0	0	0	0	0	2	4	3	7
P26043	Rdx	Radixin	1	0	7	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	2
P42208	Sept2	Septin-2	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	3	2
P46735-2	Myo1b	Isoform 2 of Unconventional myosin-Ib	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	5	1
P48678-2	Lmna	Isoform C of Prelamin-A/C	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0

P54116	Stom	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	1	0	9	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	2	3
P57780	Actn4	Alpha-actinin-4	2	1	8	0	1	0	1	0	0	0	1	2	2	2	2
P58281-2	Opa1	Isoform 2 of Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
P59999	Arpc4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
P60710	Actb	Actin, cytoplasmic 1	28	23	68	9	5	7	7	7	6	4	6	14	17	15	22
P61164	Actr1a	Alpha-centractin	3	0	2	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0
P62962	Pfn1	Profilin-1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1
P63260	Actg1	Actin, cytoplasmic 2	28	23	67	9	5	7	7	7	6	4	6	14	16	15	22
P68368	Tuba4a	Tubulin alpha-4A chain	20	18	37	4	4	6	6	7	3	2	6	10	7	9	11
P68369	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain	22	26	45	6	5	5	6	8	4	4	10	10	9	13	13
P68372	Tubb4b	Tubulin beta-4B chain	12	9	40	1	1	5	5	3	1	1	4	9	4	16	11
P99024	Tubb5	Tubulin beta-5 chain	16	11	44	3	1	6	6	4	2	1	4	9	5	18	12
Q61879	Myh10	Myosin-10	5	0	27	0	5	0	0	0	0	0	0	8	3	14	2
Q64727	Vcl	Vinculin	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	5	2
Q69ZN7	Myof	Myoferlin	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2
Q7TPR4	Actn1	Alpha-actinin-1	2	1	8	0	1	0	1	0	0	0	1	1	2	3	2
Q8BFZ3	Actb2	Beta-actin-like protein 2	4	6	14	1	1	1	1	1	2	1	2	3	5	2	4
Q8BTM8	Flna	Filamin-A	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	5
Q8R1F1	Fam129b	Niban-like protein 1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	1
Q8VDD5	Myh9	Myosin-9	10	10	38	2	1	3	4	3	2	1	4	7	5	18	8
Q99JY9	Actr3	Actin-related protein 3	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	2
Q9JHU4	Dync1h1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	32	14	21	0	6	14	12	6	1	1	6	5	1	11	4
Q9WTI7-3	Myo1c	Isoform 3 of Unconventional myosin-Ic	6	2	44	1	2	2	1	2	0	0	0	11	12	10	11
Q9WUM3	Coro1b	Coronin-1B	0	1	5	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	0	1
Q9WV32	Arpc1b	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<b>Defense/immunity proteins</b>																	
P01897	H2-L	H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain	4	2	6	1	0	1	2	1	0	0	1	0	2	0	4
P01899	H2-D1	H-2 class I histocompatibility antigen, D-B alpha chain	6	1	8	2	1	2	1	0	0	0	1	0	2	1	5
P03991	H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen, K-W28 alpha chain	5	0	7	1	1	1	2	0	0	0	0	0	2	1	4
P14426	H2-D1	H-2 class I histocompatibility antigen, D-K alpha chain	5	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Q8R366	Igsf8	Immunoglobulin superfamily member 8	4	1	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>Enzyme modulators</b>																	
P08752	Gnai2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	4	0	14	2	0	1	1	0	0	0	0	4	3	2	5
P14685	Psmc3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	6	4	9	0	1	2	3	2	0	0	2	3	1	4	1
P18872-2	Gnao1	Isoform Alpha-2 of Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	1	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3
P19324	Serpinh1	Serpin H1	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	2
P20352	F3	Tissue factor	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
P21278	Gna11	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1
P21279	Gnaq	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	1
P31324	Prkar2b	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	1	1	5	0	0	0	1	0	0	0	1	2	1	0	2
P50396	Gdi1	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
P61205	Arf3	ADP-ribosylation factor 3	1	0	10	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	5	3
P62746	Rhob	Rho-related GTP-binding protein Rhob	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
P62827	Ran	GTP-binding nuclear protein Ran	4	5	11	1	2	1	0	2	2	0	1	2	2	4	3
P62874	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	3	0	11	2	0	1	0	0	0	0	0	5	4	0	2
P62880	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	6	0	19	3	0	2	1	0	0	0	0	7	5	3	4
P63094-2	Gnas	Isoform Gnas-2 of Guanine nucleotide-binding protein G(s)	1	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5

		subunit alpha isoforms short															
P68040	Gnb2l1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 Isoform 2 of Rab GDP	22	14	24	6	3	7	6	7	3	0	4	7	6	7	4
Q61598-2	Gdi2	dissociation inhibitor beta Inter-alpha-trypsin inhibitor	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	3
Q61703	Itih2	heavy chain H2 Isoform 2 of Cytoplasmic	6	8	2	2	0	2	2	2	2	2	2	0	0	1	1
Q7TMB8-2	Cyfp1	FMR1-interacting protein 1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2
Q8VDM4	Psm2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	4	6	5	1	2	0	1	2	0	1	3	1	1	3	0
Q91YH5	Atl3	Atlantin-3	3	1	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Q99JI6	Rap1b	Ras-related protein Rap-1b Rho GDP-dissociation inhibitor	3	3	9	1	0	0	2	1	0	0	2	3	3	2	1
Q99PT1	Arhgdia	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
Q9DC51	Gnai3	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	1	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2
Q9ERK4	Cse1l	Exportin-2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Q9JKF1	Iqgap1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	2	4
<b>Extracellular matrix proteins</b>																	
A2ASQ1-2	Agri	Isoform 2 of Agrin EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein	12	12	18	0	4	5	3	4	2	2	4	2	0	2	14
O35474	Edil3	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
O35988	Sdc4	Syndecan-4	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O88322	Nid2	Nidogen-2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
P02468	Lamc1	Laminin subunit gamma-1	27	21	7	3	4	10	10	5	3	4	9	1	0	1	5
P02469	Lamb1	Laminin subunit beta-1	12	12	2	1	1	5	5	3	2	3	4	0	0	0	2
P10493	Nid1	Nidogen-1	38	41	9	8	6	12	12	7	4	12	18	0	0	4	5
P11087	Col1a1	Collagen alpha-1(I) chain	17	16	0	4	1	7	5	5	1	4	6	0	0	0	0
P11276	Fn1	Fibronectin	128	131	11	29	21	38	40	27	22	38	44	0	0	0	11
P16045	Lgals1	Galectin-1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2
P28653	Bgn	Biglycan	13	7	22	3	2	4	4	4	1	0	2	7	3	7	5
P33434	Mmp2	72 kDa type IV collagenase	4	4	0	1	0	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
P37889	Fbln2	Fibulin-2	98	90	10	20	22	28	28	22	15	27	26	2	1	3	4
P39061-2	Col18a1	Isoform 3 of Collagen alpha-1(XVIII) chain	1	1	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	2
P51655	Gpc4	Glypican-4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
P97927	Lama4	Laminin subunit alpha-4	37	24	13	5	8	13	11	7	3	8	6	3	0	1	9
Q01149	Col1a2	Collagen alpha-2(I) chain	5	1	0	0	0	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Q02788	Col6a2	Collagen alpha-2(VI) chain	120	123	1	26	19	34	41	36	22	31	34	0	0	1	0
Q04857	Col6a1	Collagen alpha-1(VI) chain	133	154	17	23	21	44	45	50	19	41	44	3	2	5	7
Q05793	Hspg2	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	105	118	142	25	5	38	37	28	9	36	45	43	13	27	59
Q07797	Lgals3bp	Galectin-3-binding protein Isoform V1 of Versican core protein	86	88	2	11	23	26	26	26	15	20	27	0	0	0	2
Q62059-2	Vcan		13	8	0	3	0	4	6	3	0	2	3	0	0	0	0
Q80YX1-2	Tnc	Isoform 2 of Tenascin MAM domain-containing protein	9	12	0	1	0	4	4	1	0	7	4	0	0	0	0
Q8CG85	Mamdc2	2	16	22	0	3	3	3	7	9	3	4	6	0	0	0	0
Q91ZX7	Lrp1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	6	5	6	0	0	3	3	2	0	1	2	2	0	1	3
Q99K41	Emilin1	EMILIN-1	64	58	2	8	10	21	25	9	9	18	22	0	0	2	0
Q9QZF2	Gpc1	Glypican-1 EGF-containing fibulin-like	6	3	10	1	5	0	0	2	1	0	0	0	0	2	8
Q9VWJ9	Efemp2	extracellular matrix protein 2	24	23	0	4	3	9	8	5	3	7	8	0	0	0	0
<b>Membrane traffic proteins</b>																	
O08992	Sdcbp	Syntenin-1	3	1	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
O35640	Anxa8	Annexin A8	2	0	6	1	0	1	0	0	0	0	0	3	0	1	2
O55029	Copb2	Coatomer subunit beta'	1	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0
P07356	Anxa2	Annexin A2	20	7	70	9	2	4	5	2	2	1	2	16	14	20	20
P10107	Anxa1	Annexin A1	8	0	36	3	1	4	0	0	0	0	0	12	5	8	11
P14824	Anxa6	Annexin A6	28	9	69	4	1	9	14	3	1	2	3	18	12	12	27



P17047-2	Lamp2	Isoform LAMP-2B of Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	1	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
P35278	Rab5c	Ras-related protein Rab-5C	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	2
P35293	Rab18	Ras-related protein Rab-18	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3
P46638	Rab11b	Ras-related protein Rab-11B	1	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1
P48036	Anxa5	Annexin A5	23	6	41	7	4	7	5	1	1	2	2	11	10	8	12
P49817-2	Cav1	Isoform 2 of Caveolin-1	5	2	1	1	0	2	2	0	0	0	2	1	0	0	0
P51150	Rab7a	Ras-related protein Rab-7a	2	0	14	1	1	0	0	0	0	0	0	4	5	1	4
P61027	Rab10	Ras-related protein Rab-10	5	0	10	1	0	2	2	0	0	0	0	3	2	3	2
P62821	Rab1A	Ras-related protein Rab-1A	3	0	10	1	0	1	1	0	0	0	0	3	1	3	3
P97384	Anxa11	Annexin A11	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
P97429	Anxa4	Annexin A4	10	1	33	5	0	3	2	1	0	0	0	8	7	11	7
Q07076	Anxa7	Annexin A7	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1
Q3U7R1-2	Esyt1	Isoform 2 of Extended synaptotagmin-1	4	2	7	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	3
Q68FD5	Cltc	Clathrin heavy chain 1 Sorting and assembly machinery component 50 homolog	115	102	69	20	28	36	31	25	15	24	38	18	9	26	16
Q8BGH2	Samm50		0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Q8BH64	Ehd2	EH domain-containing protein 2	4	4	22	1	0	1	2	2	0	0	2	5	3	6	8
Q8C166	Cpne1	Copine-1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Q8CIE6	Copa	Coatomer subunit alpha	6	7	3	0	2	2	2	1	1	1	4	0	0	3	0
Q91V41	Rab14	Ras-related protein Rab-14	3	0	9	1	0	1	1	0	0	0	0	3	2	1	3
Q9CQD1	Rab5a	Ras-related protein Rab-5A	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0
Q9D1G1	Rab1b	Ras-related protein Rab-1B	3	0	13	1	0	1	1	0	0	0	0	3	1	4	5
Q9ES97-2	Rtn3	Isoform 2 of Reticulon-3	4	1	2	1	1	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<b>Nucleic acid binding proteins</b>																	
O35737	Hnrnp1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1
O70133-2	Dhx9	Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase A	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0
P0CG49	Ubb	Polyubiquitin-B	21	15	14	7	4	7	3	5	2	3	5	4	3	3	4
P10126	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	8	6	27	2	2	3	1	2	1	0	3	8	5	10	4
P10853	Hist1h2bf	Histone H2B type 1-F/J/L	30	27	14	8	9	6	7	9	7	5	6	4	3	5	2
P10922	H1f0	Histone H1.0	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
P12970	Rpl7a	60S ribosomal protein L7a	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	3	2
P14131	Rps16	40S ribosomal protein S16	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	2
P14148	Rpl7	60S ribosomal protein L7	5	1	8	2	0	1	2	0	0	1	0	1	1	3	3
P14206	Rpsa	40S ribosomal protein SA	19	14	15	4	5	5	5	5	4	2	3	3	4	5	3
P14869	Rplp0	60S acidic ribosomal protein P0	8	5	10	2	1	3	2	2	0	0	3	3	1	3	3
P15864	Hist1h1c	Histone H1.2	16	14	14	5	6	2	3	5	4	2	3	4	4	3	3
P19253	Rpl13a	60S ribosomal protein L13a	1	0	10	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	4	4
P22752	Hist1h2ab	Histone H2A type 1 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	6	9	3	1	3	1	1	4	3	1	1	2	0	1	0
P23116	Eif3a		0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
P25444	Rps2	40S ribosomal protein S2	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	5
P26638	Sars	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1
P27659	Rpl3	60S ribosomal protein L3	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	2	5
P32067	Ssb	Lupus La protein homolog	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1
P35979	Rpl12	60S ribosomal protein L12	1	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	2	0
P35980	Rpl18	60S ribosomal protein L18	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	4	1
P41105	Rpl28	60S ribosomal protein L28	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
P42225	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	1	3	1	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1
P43274	Hist1h1e	Histone H1.4	12	14	11	4	5	1	2	6	4	2	2	4	3	2	2
P43276	Hist1h1b	Histone H1.5	5	5	1	2	2	0	1	3	1	0	1	0	0	1	0

P43277	Hist1h1d	Histone H1.3	12	13	11	3	6	1	2	4	5	2	2	4	3	1	3
P47911	Rpl6	60S ribosomal protein L6	4	0	16	2	0	1	1	0	0	0	0	4	3	4	5
P47962	Rpl5	60S ribosomal protein L5	3	2	16	1	1	0	1	1	0	1	0	2	2	8	4
P47963	Rpl13	60S ribosomal protein L13	4	0	9	2	0	1	1	0	0	0	0	3	0	3	3
P51410	Rpl9	60S ribosomal protein L9	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0
P57722-2	Pcbp3	Isoform 2 of Poly(rC)-binding protein 3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
P58252	Eef2	Elongation factor 2	6	4	16	2	1	2	1	2	0	0	2	5	1	7	3
P60335	Pcbp1	Poly(rC)-binding protein 1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
P60843	Eif4a1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	7	4	9	0	2	2	3	2	0	0	2	1	2	4	2
P61358	Rpl27	60S ribosomal protein L27	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
P62242	Rps8	40S ribosomal protein S8	11	6	18	4	2	2	3	2	1	2	1	4	5	6	3
P62264	Rps14	40S ribosomal protein S14	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1
P62267	Rps23	40S ribosomal protein S23	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1
P62270	Rps18	40S ribosomal protein S18	8	8	7	2	1	3	2	2	0	3	3	2	1	3	1
P62281	Rps11	40S ribosomal protein S11	6	3	8	0	2	2	2	3	0	0	0	2	2	3	1
P62702	Rps4x	40S ribosomal protein S4, X isoform	0	2	6	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	2	2
P62717	Rpl18a	60S ribosomal protein L18a	3	0	12	1	0	1	1	0	0	0	0	4	2	2	4
P62754	Rps6	40S ribosomal protein S6	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	5	6
P62806	Hist1h4a	Histone H4 Isoform 2 of 40S ribosomal protein S24	46	55	36	14	11	9	12	17	13	11	14	11	10	9	6
P62849-2	Rps24	40S ribosomal protein S24	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1
P62855	Rps26	40S ribosomal protein S26	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
P62889	Rpl30	60S ribosomal protein L30	2	0	8	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
P62908	Rps3	40S ribosomal protein S3	10	7	9	3	1	4	2	3	1	1	2	2	3	3	1
P62918	Rpl8	60S ribosomal protein L8	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2
P62996	Tra2b	Transformer-2 protein homolog beta	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
P84099	Rpl19	60S ribosomal protein L19 Isoform Short of Serine/arginine-rich splicing factor 3	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
P84104-2	Srsf3	Serine/arginine-rich splicing factor 3	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	1
P84228	Hist1h3b	Histone H3.2	11	14	12	2	3	2	4	4	4	3	3	4	2	3	3
P97351	Rps3a	40S ribosomal protein S3a	3	1	16	1	0	1	1	1	0	0	0	4	2	4	6
P97461	Rps5	40S ribosomal protein S5	7	3	9	1	2	2	2	2	0	1	0	2	1	4	2
P97499	Tep1	Telomerase protein component 1	6	0	0	0	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Q501J6	Ddx17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 Isoform 2 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	4	4	8	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1
Q55F07-2	Igf2bp2	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
Q61656	Ddx5	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	7	6	9	1	2	2	2	2	1	1	2	4	2	2	1
Q62167	Ddx3x	Isoform 2 of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0
Q62376-2	Snrnp70	Histone H2A type 2-C	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
Q64523	Hist2h2ac	Xaa-Pro aminopeptidase 1 Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	5	7	6	2	2	1	0	3	3	1	0	3	0	3	0
Q6P1B1	Xpnp1	40S ribosomal protein S9	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
Q6ZQ38	Cand1	60S ribosomal protein L35	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	1
Q6ZWN5	Rps9	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4
Q6ZVV7	Rpl35	Isoform 2 of Serine/arginine-rich splicing factor 7	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Q78PY7	Snd1	Cytoskeleton-associated protein 4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
Q8BL97-2	Srsf7	60S ribosomal protein L24	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0
Q8BMK4	Ckap4	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Q8BP67	Rpl24	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1
Q8C0C7	Farsa	Ribonuclease inhibitor	6	7	6	2	1	1	2	2	1	2	2	2	0	2	2
Q8VEK3	Hnrnpu		0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	3	4
Q91VI7	Rnh1		0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2

Q99MN1	Kars	Lysine--tRNA ligase	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
Q9CQF9	Pcyox1	Prenylcysteine oxidase	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	2
Q9CR57	Rpl14	60S ribosomal protein L14	3	2	8	1	0	1	1	0	1	1	0	3	1	3	1
Q9CZM2	Rpl15	60S ribosomal protein L15	1	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	3	0
Q9D8E6	Rpl4	60S ribosomal protein L4	2	1	19	0	0	1	1	1	0	0	0	4	3	5	7
Q9D8N0	Eef1g	Elongation factor 1-gamma Electron transfer flavoprotein subunit beta	7	7	16	2	3	1	1	2	1	1	3	4	3	5	4
Q9DCW4	Etfb		4	0	11	1	1	1	1	0	0	0	0	2	3	2	4
Q9EQK5	Mvp	Major vault protein Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	133	120	12	23	36	39	35	35	26	24	35	5	2	3	2
Q9QZD9	Eif3i	Spliceosome RNA helicase	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Q9Z1N5	Ddx39b	Ddx39b	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
Q9Z1Q9	Vars	Valine--tRNA ligase	4	5	5	0	2	1	1	1	1	1	2	1	0	4	0
<b>Proteins with enzymatic activities</b>																	
B2RQC6-2	Cad	Isoform 2 of CAD protein Phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	1	1	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0
O08586	Pten	Dihydropyridin dehydrogenase, mitochondrial	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
O08749	Dld	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0	5
O08756	Hsd17b10	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0
O35855	Bcat2	Dolichyl- diphosphoglycosyltransferase 48 kDa subunit	3	0	9	0	3	0	0	0	0	0	0	2	5	0	2
O54734	Ddost	Membrane primary amine oxidase	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
O70423	Aoc3	Estradiol 17-beta- dehydrogenase 12	11	6	23	1	2	4	4	2	0	1	3	7	6	2	8
O70503	Hsd17b12	26S protease regulatory subunit 6A	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1
O88685	Psmc3	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
O88844	Idh1	Fructose-bisphosphate aldolase A	0	1	18	0	0	0	0	1	0	0	0	4	4	6	4
P05064	Aldoa	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	3	1	25	0	0	1	2	0	0	0	1	9	4	6	6
P05202	Got2	L-lactate dehydrogenase A chain	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	1
P06151	Ldha	Superoxide dismutase [Cu-Zn] Malate dehydrogenase, mitochondrial	2	0	15	1	0	1	0	0	0	0	0	5	3	4	3
P08228	Sod1		3	0	4	1	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0
P08249	Mdh2		16	0	35	2	7	4	3	0	0	0	0	10	13	3	9
P09411	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1 Delta-aminolevulinic acid dehydratase	4	3	9	0	1	2	1	2	0	0	1	2	1	3	3
P10518	Alad	Isoform 2 of 4F2 cell-surface antigen heavy chain	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
P10852-2	Slc3a2	ATP-dependent 6- phosphofructokinase, liver type	1	0	19	1	0	0	0	0	0	0	0	4	2	7	6
P12382	Pfkl	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	5	3	11	0	2	3	0	2	0	0	1	4	1	5	1
P13707	Gpd1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6	2	18	2	1	2	1	2	0	0	0	5	5	3	5
P14152	Mdh1	L-lactate dehydrogenase B chain	3	0	13	0	2	0	1	0	0	0	0	5	3	4	1
P16125	Ldhb	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	0	4	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	1
P16858	Gapdh		14	14	23	6	2	3	3	4	3	2	5	5	4	7	7
P17182	Eno1	Alpha-enolase Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	16	6	30	3	4	4	5	3	1	0	2	10	5	7	8
P17742	Ppia		3	0	10	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1	4	3
P17751	Tpi1	Triosephosphate isomerase	2	4	19	0	1	0	1	1	1	1	1	6	5	4	4
P19096	Fasn	Fatty acid synthase	121	110	85	14	29	42	36	29	21	27	33	29	8	37	11
P19157	Gstp1	Glutathione S-transferase P 1	4	2	6	1	1	1	1	1	0	0	1	3	1	1	1
P24270	Cat	Catalase	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	7	7
P26443	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	2	0	9	1	1	0	0	0	0	0	0	2	3	1	3
P28271	Aco1	Cytoplasmic aconitate hydratase	10	13	15	0	6	2	2	5	1	1	6	3	3	6	3
P29341	Pabpc1	Polyadenylate-binding protein 1 Isoform 2 of Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
P32921-2	Wars		0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

P34914	Ephx2	Bifunctional epoxide hydrolase 2	1	0	9	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	6	0
P35486	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1
P35505	Fah	Fumarylacetoacetase	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
P35700	Prdx1	Peroxiredoxin-1	1	0	16	1	0	0	0	0	0	0	0	3	6	5	2
P37040	Por	NADPH--cytochrome P450 reductase	1	0	14	1	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	6
P40142	Tkt	Transketolase	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	4
P41216	Acs1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	57	36	101	16	6	16	19	10	6	6	14	20	29	17	35
P45376	Akr1b1	Aldose reductase	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1
P45952	Acadm	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	5	2	12	2	2	0	1	1	0	0	1	2	6	1	3
P46471	Psmc2	26S protease regulatory subunit 7	3	4	1	0	0	1	2	2	0	0	2	0	0	1	0
P46935	Nedd4	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	0
P47738	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	9	4	20	3	2	3	1	3	0	0	1	4	7	4	5
P47934	Crat	Carnitine O-acetyltransferase	6	3	11	3	2	0	1	2	0	0	1	3	3	3	2
P48758	Cbr1	Carbonyl reductase [NADPH] 1	9	7	6	3	1	2	3	3	1	0	3	2	2	2	0
P50136	Bckdha	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
P50247	Ahcy	Adenosylhomocysteinase	6	5	8	1	1	2	2	4	1	0	0	4	0	3	1
P50544	Acadvl	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	1	0	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	3
P51174	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2
P51660	Hsd17b4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	12	2
P52480	Pkm	Pyruvate kinase PKM	3	7	20	0	0	2	1	3	1	1	2	5	3	8	4
P52480-2	Pkm	Isoform M1 of Pyruvate kinase PKM	3	5	23	0	0	2	1	2	1	0	2	6	3	9	5
P52825	Cpt2	Carnitine	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	4
P54071	Idh2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0	3
P54310-2	Li	Isoform 2 of Hormone-sensitive lipase	9	12	16	1	2	2	4	3	3	1	5	3	2	6	5
P62192	Psmc1	26S protease regulatory subunit 4	3	4	1	0	0	1	2	1	1	0	2	0	0	1	0
P62196	Psmc5	26S protease regulatory subunit 8	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0
P62334	Psmc6	26S protease regulatory subunit 10B	2	3	1	0	0	2	0	2	0	0	1	1	0	0	0
P62715	Ppp2cb	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	5	4	1	0	1	2	2	1	0	0	3	0	0	1	0
P70404	Idh3g	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
P97807-2	Fh	Isoform Cytoplasmic of Fumarate hydratase, mitochondrial	1	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1
P97873	Loxl1	Lysyl oxidase homolog 1	32	28	23	5	4	12	11	4	2	9	13	3	2	14	4
Q00519	Xdh	Xanthine dehydrogenase/oxidase	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	5	0
Q00612	G6pdx	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	6	1
Q01853	Vcp	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	18	15	17	4	2	6	6	3	0	4	8	7	3	4	3
Q05920	Pc	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	62	69	104	13	15	17	17	23	13	14	19	22	32	20	30
Q07417	Acads	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0
Q3UM45	Ppp1r7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Q5SWU9-2	Acaca	Isoform 2 of Acetyl-CoA carboxylase 1	27	39	5	1	6	9	11	13	4	7	15	0	0	4	1
Q60597-2	Ogdh	Isoform 2 of 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
Q60737	Csnk2a1	Casein kinase II subunit alpha	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
Q61024	Asns	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	2	6	4	0	0	1	1	2	0	1	3	1	0	3	0
Q61398	Pcolce	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	5	3	0	1	0	3	1	2	0	0	1	0	0	0	0
Q61753	Phgdh	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0	1	14	0	0	0	0	1	0	0	0	4	5	3	2
Q62465	Vat1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	1	4
Q64521	Gpd2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0

Q6PB66	Lrpprc	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Q76MZ3	Ppp2r1a	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	2	0	5	0	0	0	2	0	0	0	0	3	1	0	1
Q8BH04	Pck2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
Q8BH95	Echs1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3
Q8BJ56-2	Pnpla2	Isoform 2 of Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1
Q8BKZ9	Pdhx	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
Q8BMF4	Dlat	Dihydrolipoylysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	7	7	4	1	1	3	2	3	1	1	2	1	2	1	0
Q8BMS1	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	1	0	34	1	0	0	0	0	0	0	0	7	13	3	11
Q8BWT1	Acaa2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Q8C129	Lnp	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	0	2	7	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	2	1
Q8CG76	Akr7a2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	6	3	3	1	3	1	1	1	0	1	1	0	1	2	0
Q8CGC7	Eprs	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	1	0	14	0	1	0	0	0	0	0	0	5	1	5	3
Q8CGK3	Lonp1	Lon protease homolog, mitochondrial	1	0	10	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4	0	3
Q8CI94	Pygb	Glycogen phosphorylase, brain form	12	10	26	2	4	3	3	4	4	0	2	9	3	10	4
Q8K0C9	Gmds	GDP-mannose 4,6 dehydratase	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
Q8K2B3	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	4
Q8K354	Cbr3	Carbonyl reductase [NADPH] 3	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1
Q8QZT1	Acat1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	4
Q8R180	Ero1l	ERO1-like protein alpha	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Q8VCT4	Ces1d	Carboxylesterase 1D	1	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2
Q91V01	Lpcat3	Lysophospholipid acyltransferase 5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Q91V92	Acly	ATP-citrate synthase	7	8	5	0	2	2	3	1	2	2	3	1	1	2	1
Q91VD9	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2
Q91VS7	Mgst1	Microsomal glutathione S-transferase 1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2
Q91YQ5	Rpn1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	1	0	10	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	3
Q91ZE0	Tmlhe	Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Q921H8	Acaa1a	3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	8	1
Q922D8	Mthfd1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Q93092	Taldo1	Transaldolase	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	3
Q99J47-2	Dhrs7b	Isoform 2 of Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
Q99J99	Mpst	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	4	2	4	1	0	1	2	1	0	0	1	1	0	2	1
Q99JY0	Hadhb	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	1
Q99K85	Psat1	Phosphoserine aminotransferase	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
Q99KI0	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	9	6	23	2	3	1	3	4	1	0	1	4	9	1	9
Q99L13	Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2
Q99LC5	Etfa	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	1	7
Q9CPU4	Mgst3	Microsomal glutathione S-transferase 3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Q9CPY7-2	Lap3	Isoform 2 of Cytosol aminopeptidase	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
Q9CQ60	Pgls	6-phosphogluconolactonase	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1
Q9CQ62	Decr1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Q9CQA3	Sdhb	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1

Q9CWX9	Atic	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0
Q9CZ13	Uqrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	3
Q9CZD3	Gars	Glycine--tRNA ligase	5	8	11	1	2	1	1	3	1	0	4	3	1	4	3
Q9CZU6	Cs	Citrate synthase, mitochondrial Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	12	12	11	2	3	4	3	5	2	2	3	2	4	2	3
Q9D051	Pdhd		0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	3
Q9D0F9	Pgm1	Phosphoglucomutase-1 Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
Q9D0K2	Oxct1		3	0	8	1	1	1	0	0	0	0	0	1	3	1	3
Q9D2R0	Aacs	Acetoacetyl-CoA synthetase	1	1	5	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	2	0
Q9D379	Ephx1	Epoxide hydrolase 1 Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Q9D6R2	Idh3a	Adipocyte plasma membrane-associated protein	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	4
Q9D7N9	Apmap		0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
Q9DB77	Uqrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2
Q9DBE0	Csad	Cysteine sulfinic acid decarboxylase Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	1	2	5	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2	2
Q9DBG6	Rpn2		0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4
Q9DBJ1	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1 Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	4	4	9	1	0	1	2	2	0	0	2	3	1	2	3
Q9DBL1	Acadsb	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Q9DCD0	Pgd		0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	1
Q9EPL9	Acox3	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
Q9EQ20	Aldh6a1	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	11	3	19	3	2	3	3	0	1	0	2	3	6	2	8
Q9JH15	Ivd	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 Isoform 2 of Adenylate kinase 2, mitochondrial	6	1	11	2	1	2	1	0	0	0	1	2	4	0	5
Q9R0E1	Plod3		0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Q9R0E2	Plod1		8	2	0	0	1	4	3	1	0	1	0	0	0	0	0
Q9WTP6-2	Ak2		0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Q9WVL0	Gstz1	Maleylacetoacetate isomerase Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	1	3	2	0	0	0	1	2	0	0	1	0	1	0	1
Q9Z0X1	Aifm1	Glycogen [starch] synthase, muscle	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Q9Z1E4	Gys1	Chloride intracellular channel protein 1	7	5	3	0	0	4	3	0	0	3	2	1	0	2	0
Q9Z1Q5	Clic1	Isoform 2 of Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Q9Z2I8-2	Suclg2		0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3
<b>Integral proteins and receptors</b>																	
O35682	Myadm	Myeloid-associated differentiation marker	4	1	8	2	0	2	0	1	0	0	0	2	2	2	2
P09055-2	Itgb1	Isoform 2 of Integrin beta-1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
P11688	Itga5	Integrin alpha-5	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	0
P17427	Ap2a2	AP-2 complex subunit alpha-2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
P18572-2	Bsg	Isoform 2 of Basigin	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3	4
P35762	Cd81	CD81 antigen Isoform	8	3	3	2	1	2	3	1	0	0	2	1	1	0	1
P99029-2	Prdx5	Cytoplasmic+peroxisomal of Peroxiredoxin-5, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
Q08857	Cd36	Platelet glycoprotein 4	3	2	9	1	0	2	0	0	0	0	2	1	2	3	3
Q3V1G4	Olfml2b	Olfactomedin-like protein 2B Isoform Alpha-6X1A of Integrin alpha-6	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Q61739-2	Itga6		1	0	9	0	0	1	0	0	0	0	0	3	2	3	1
Q8C1E7	Tmem120a	Transmembrane protein 120A Isoform 2 of MICOS complex subunit Mic60, Mitofilin	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
Q8CAQ8-2	Immt	Isoform 3 of Programmed cell death 6-interacting protein, Alix	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	4
Q9WU78-3	Pdcd6ip		13	4	1	1	1	8	3	0	0	0	4	0	0	1	0
<b>Transporters, transfer and carrier proteins</b>																	

G5E829	Atp2b1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 Isoform 2 of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1
O55143-2	Atp2a2		0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	2
O88492-2	Plin4	Isoform 2 of Perilipin-4	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2
P01942	Hba	Hemoglobin subunit alpha	8	4	7	3	1	2	2	2	0	1	1	1	1	2	3
P04117	Fabp4	Fatty acid-binding protein, adipocyte	15	3	35	3	4	3	5	0	0	1	2	11	6	9	9
P09528	Fth1	Ferritin heavy chain	8	5	0	2	1	3	2	1	1	1	2	0	0	0	0
P14211	Calr	Calreticulin	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4	4
P29391	Ftl1	Ferritin light chain 1	10	9	1	2	1	4	3	3	2	1	3	0	0	0	1
P48962	Slc25a4	ADP/ATP translocase 1 V-type proton ATPase catalytic subunit A	1	0	23	1	0	0	0	0	0	0	0	9	6	4	4
P50516	Atp6v1a		0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	5
P51881	Slc25a5	ADP/ATP translocase 2 Neutral amino acid transporter B(0)	2	0	22	2	0	0	0	0	0	0	0	7	8	4	3
P51912	Slc1a5		0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1
P56480	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial Calcineurin B homologous protein 1	22	17	48	5	6	6	5	5	5	3	4	12	14	7	15
P61022	Chp1	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1
P62814	Atp6v1b2		1	0	12	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	3	3
P70168	Kpnb1	Importin subunit beta-1 Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	1	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1
Q02053	Uba1		29	23	33	5	9	8	7	7	6	3	7	7	5	13	8
Q03265	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial Fatty acid-binding protein, epidermal	16	3	45	4	4	4	4	1	1	0	1	8	19	8	10
Q05816	Fabp5	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 Isoform Mt-VDAC1 of Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1	0	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3
Q60930	Vdac2	Isoform 2 of Protein tweety homolog 3	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	3
Q60932-2	Vdac1		0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	0	3
Q6P5F7-2	Ttyh3		5	0	0	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q8BVE3	Atp6v1h	V-type proton ATPase subunit H	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1
Q8CGN5-2	Plin1	Isoform 2 of Perilipin-1 Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
Q8JZU2	Slc25a1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Q8VDN2	Atp1a1	ATPase subunit alpha-1 Phosphate carrier protein, mitochondrial	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	5	5
Q8VEM8	Slc25a3	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Q91VR2	Atp5c1		0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1
Q99JR1	Sfxn1	Sideroflexin-1 ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Q9CQK7	Atp5f1	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
Q9CR62	Slc25a11		0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2
Q9DB20	Atp5o	ATP synthase subunit d, mitochondrial	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1
Q9DCX2	Atp5h	Mitochondrial dicarboxylate carrier	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Q9QZD8	Slc25a10		0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	3
<b>Signaling molecules</b>																	
P01027	C3	Complement C3	9	4	5	2	2	4	1	2	1	1	0	0	0	1	4
P01029	C4b	Complement C4-B	5	3	1	0	0	3	2	2	0	1	0	0	0	0	1
P11152	Lpl	Lipoprotein lipase	44	53	33	11	9	12	12	17	11	9	16	7	5	11	10
P21956-2	Mfge8	Isoform 2 of Lactadherin	43	26	40	13	6	11	13	7	3	5	11	7	7	6	20
P63089	Ptn	Pleiotrophin	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q60994	Adipoq	Adiponectin Nicotinamide phosphoribosyltransferase, Visfatin	18	18	5	4	4	6	4	5	4	4	5	0	2	1	2
Q99KQ4	Nampt		0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
<b>Miscellaneous</b>																	
O35129	Phb2	Prohibitin-2 Proteasome subunit alpha type-3	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10	2	9
O70435	Psm3		4	2	5	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2
P08003	Pdia4	Protein disulfide-isomerase A4	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2

P09103	P4hb	Protein disulfide-isomerase	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	4	6
P27773	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	4	0	31	2	1	0	1	0	0	0	0	4	9	9	9
P67778	Phb	Prohibitin Membrane-associated progesterone receptor component 2	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	7	5	0	9
Q80UU9	Pgrmc2	Protein disulfide-isomerase A6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Q922R8	Pdia6	Protein disulfide-isomerase A6	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	4
Q9QUM9	Psm6	Proteasome subunit alpha type- 6	2	2	2	1	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0	0
Q9R1P4	Psm1	Proteasome subunit alpha type- 1	1	2	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0





## **Annexe 2**

### **« Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases »**

*Audrey Fleury, Maria Carmen Martinez \* and Soazig Le Lay \**

*Front Immunol. 2014 Aug 4;5:370*





# Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases

Audrey Fleury, Maria Carmen Martinez\* and Soazig Le Lay\*

INSERM U1063 "Oxidative Stress and Metabolic Pathologies," Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Angers, France

## Edited by:

Francesc E. Borrás, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Spain

## Reviewed by:

Maria Mittelbrunn, National Center of Cardiovascular Research, Spain  
Martial Ruat, INSERM, France

## \*Correspondence:

Maria Carmen Martinez and Soazig Le Lay, INSERM UMR 1063 "Oxidative Stress and Metabolic pathologies," Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, 4 rue Larrey, Angers F-49933, France  
e-mail: carmen.martinez@univ-angers.fr;  
soazig.lelay@inserm.fr

Extracellular vesicles (EVs), including microvesicles (MVs) and exosomes, are small vesicles secreted from a wide variety of cells. Whereas MVs are particles released by the outward budding of the plasma membrane, exosomes are derived from endocytic compartments. Secretion of EVs can be enhanced by specific stimuli, and increased plasma circulating levels of EVs have been correlated with pathophysiological situations. MVs, already present in the blood of healthy individuals, are considerably elevated in several cardiovascular diseases associated with inflammation, suggesting that they can mediate deleterious effects such as endothelial dysfunction or thrombosis. Nonetheless, very recent studies also demonstrate that MVs may act as biological information vectors transferring proteins or genetic material to maintain cell homeostasis, favor cell repair, or even promote angiogenesis. Additionally, exosomes have also been shown to have pro-angiogenic and cardio-protective properties. These beneficial effects, therefore, reveal the potential therapeutical use of EVs in the field of cardiovascular medicine and regenerative therapy. In this review, we will provide an update of cellular processes modulated by EVs of specific interest in the treatment of cardiovascular pathologies. A special focus will be made on the morphogen sonic hedgehog (Shh) associated with EVs (EVs<sup>Shh+</sup>), which have been shown to mediate many pro-angiogenic effects. In addition to offer a potential source of cardiovascular markers, therapeutical potential of EVs reveal exciting opportunities to deliver specific agents by non-immunogenic means to cardiovascular system.

**Keywords:** extracellular vesicle, microparticles, microvesicles, exosomes, cardiovascular diseases, angiogenesis, sonic hedgehog, therapeutical tools

## INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) comprising exosomes (<100 nm of size), microparticles, and apoptotic bodies (100–1200 nm in size) are physiologically released by almost all cell types and represent endogenous cargos that are able to participate in cell-to-cell communication. The composition of EVs determines the type of message, which they can convey. Indeed, EVs are rich in proteins, mRNAs, and miRNAs as well as lipids, which they can transfer to target cells by ligand/receptor interaction, fusion, and/or internalization. Manipulation of cells generating EVs by pharmacological treatment or transfection allow to produce EVs rich in specific components that can affect selectively the functions of target cells. In this article, we will review the current knowledge of the function and impact of EVs used as therapeutic tools against cardiovascular diseases.

## EVs: POTENTIAL DELIVERY TOOLS/VECTORS IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

In addition to their different size, the criteria that are used to distinguish between the various types of EVs are based on the cellular compartment that they originate from and on their composition (1). While exosomes are formed from the multivesicular bodies, both microparticles and apoptotic bodies come from plasma membrane. Obviously, composition of EVs depends on the type of (i) cells that they are from and (ii) stimulation that generates their

release. Thereby, specific antigens carried by EVs allow the identification of donor/producer cell, whereas use of different agents to stimulate EV generation allows achieving EVs with different potential effects.

Extracellular vesicles have been isolated from the main fluids of the organism and from several solid tissues (tumors, atheroma plaque, skeletal muscle. . .). However, it is difficult to establish the exact nature of EVs from solid tissues, as the recovered materials can also comprise intracellular vesicles released during the tissue dissociation process (2). In addition to their physiological role during development and homeostasis, some pathophysiological situations will enhance release of EVs and affect composition of EVs or both. Thus, during cardiovascular diseases, both elevated levels and different composition of EVs have been described suggesting that EVs may represent potential novel targets for therapeutic intervention (3, 4). Of note, circulating endothelial EVs were associated with the presence of cardiometabolic risk factors in a community cohort underscoring the potential influence of high-risk metabolic profiles on endothelium activation or injury (5). Given the fact that elevated EV levels often correlate with the severity of cardiovascular diseases, one strategy would consist in reducing circulating EVs to normal levels in order to prevent associated deleterious signaling. In this perspective, many ongoing studies are designed to evaluate changes in circulating EV levels in response to pharmacological treatment used [for review, see

Ref. (6)]. However, such strategies do not allow distinguishing between effects of drugs on EV generation and/or EV clearance. An alternative to modulate EV production would be either to act on processes regulating their formation and/or release or to inhibit their interaction with target cells through specific targeting of their components (receptors, ligands, lipids. . .) (7). Notably, inhibition of ceramide formation by the use of amiloride drug reduces significantly mouse and human tumor cell growth by blocking secretion of heat shock protein-72 (HSP 72) EV-associated protein (8). While no studies using such strategies have been yet described in cardiovascular field, a limiting step is also linked to the lack of specificity of targeting mechanisms regulating EV formation and release, which may produce many unwanted effects.

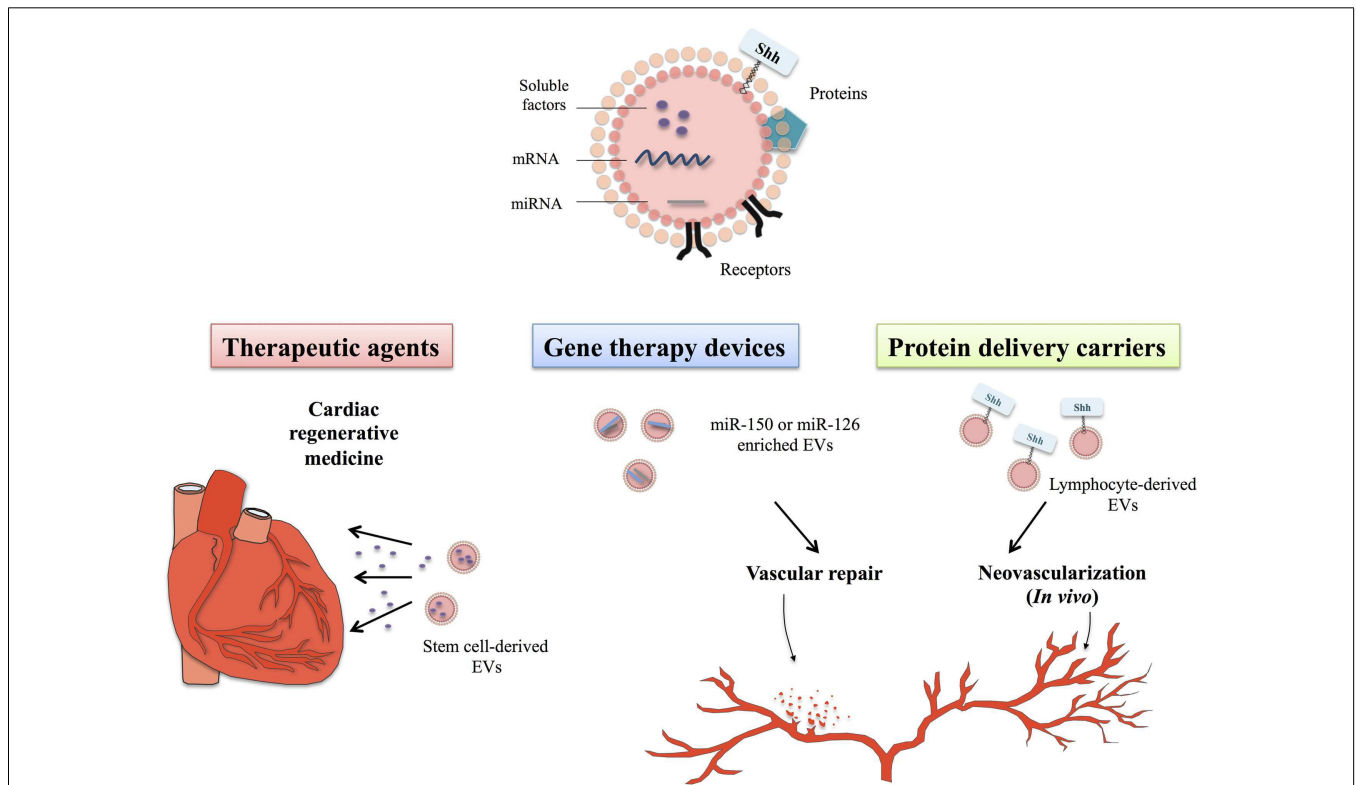
Alternatively, EVs constitute promising therapeutic delivery tools in cardiovascular diseases. Their general capacity to act as bioactive cargoes, particularly through their ability to carry secretory molecules such as cytokines, chemokines, or growth factors as well as exogenous nucleic acids, highlight them as attractive vehicles (9). In addition, EVs are able to use the vasculature to signal at considerable distance from their donor cell origin. In this

respect, central nervous system-derived EVs could enter the bloodstream and communicate with endothelial cells in the peripheral circulation and with cells involved in immune surveillance (10).

Although largely identified as deleterious carriers, EVs might also have beneficial effects and deliver protective messages to preserve endothelial function and/or vascular integrity. Indeed, circulating EVs from sepsis patients are able to restore vascular hyporeactivity in vessels treated by lipopolysaccharide (11). In agreement, high circulating levels of EVs correlate with survival in sepsis patients (12). Besides this EV-mediated adaptive/protective response, EVs have demonstrated regenerative capacities, mainly when they derived from progenitor or mesenchymal stem cells (MSC), therefore, opening perspectives to use their innate properties in regenerative medicine (Figure 1).

### Therapeutic Use of MSC-Derived EVs in Cardiac Regenerative Medicine

Cardiac regenerative therapy, based on intramyocardial injection of MSCs, has been in the last few years one of the most promising approaches to both prevent cardiac damage and allow



**FIGURE 1 | Therapeutic potential of extracellular vesicles in the context of cardiovascular disorders.** Extracellular vesicles (EVs) constitute bioactive cargoes, particularly through their ability to carry proteins, receptors but also genetic material including microRNA (miRNA) or mRNA. Since EVs participate actively in the modulation of many physiological processes, they can be used as therapeutic agents in cardiac regenerative medicine. Improvement of cardiac function depends on the EV-transfer of specific factors, such as soluble proteins, growth factors, lipids, or genetic material. Use of stem cell-derived EVs in cardiac regenerative therapies, therefore, allows delivering specific signals by non-immunogenic means to heart. As EVs naturally contain genetic

material, cell sources can be genetically manipulated to produce EVs specifically loaded with miRNA of choice, such as miR-150 or miR-126, described as important regulators of angiogenesis or vascular integrity. Treatment of endothelial cells or vascular tissues with these miRNA-enriched EVs has demonstrated their protective and regenerative properties on cardiovascular system. Specific culture system might also allow to specifically targeting molecules of interest to EVs, like the morphogen Shh that is an important regulator of injury-induced angiogenesis and neovascularization. Use of EVs<sup>Shh+</sup> even appears in this context more powerful than classical recombinant Shh protein, likely linked to its localization within natural EV membranous environment.

cardiac repair. However, experimental or clinical studies demonstrate insufficient cardiomyocyte or vascular cell differentiation to account for improvements of cardiac function (13). This led to formulate the paracrine-hypothesis according to which soluble factors derived from MSCs would be responsible for beneficial outcomes (14, 15). First evidences establishing that cellular secretions are cardio-protective resulted from administration of MSC-derived conditioned medium to rodents and pigs, which results in reduced infarct size and led to improved heart function (16–18). Also, exosomal fraction contained in MSC-conditioned medium mediates preservation of cardiac function after ischemia/reperfusion injury (19). These protective effects likely result from decreased oxidative stress and activation of PI3K/Akt pathway, which enhance myocardial viability and prevent adverse cardiac remodeling (20). Of note, EVs derived from bone marrow CD34<sup>+</sup> stem cells or endothelial progenitor cells (EPCs) have been shown to promote angiogenesis (21, 22).

Of great interest is the recently reported potential of EVs, particularly exosomes, derived from cardiac progenitor cells (CPC). Indeed, CPC-derived EVs have been shown to stimulate migration of endothelial cells (23) and to protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury (24). This would, therefore, open new perspectives to directly used EVs derived from cells present in the heart itself. Accordingly, electron microscopic imaging of CPCs and adult mouse hearts has revealed the release of vesicles, which would have the morphological characteristics of EVs (25).

Altogether, the use of stem cell-derived EVs instead of stem cells engraftment might open new perspectives for cardiac regenerative therapies. This would first resolve safety concerns related to uncontrolled dissemination of transplanted cells or aberrant stem cell differentiation. In addition, immunosuppressive effects reported for certain EVs could favor efficient cardiac tissue regeneration (26). Moreover, since exosomes could be easily stored and keep their biological properties over an extended storage period, they can overcome many of the limitations linked to the use of viable cells in regenerative medicine. However, further investigations would be needed to optimize their characterization, quality, and purification in order to accurately control their production in the perspective of clinical uses (27). In particular, pro or anti-tumor effects reported for MSC-derived EVs would need to be fully understood and highly regulated (28, 29).

### EVs AS GENE-THERAPY DEVICES

As described above, EV composition and cargoes transported (proteins, genetic material, lipids) vary with cell origin. In addition to use them as delivery vector for specific proteins, their ability to transport and deliver genetic material to non-adjacent cells have highlighted their potential as new delivery vectors in gene-therapy (see **Figure 1**).

Extracellular vesicles derived from stem cells are reported as carriers for nucleic acids, which by horizontal transfer of mRNAs are able to reprogram hematopoietic progenitors (30). Subsequently, EPCs are also shown to activate angiogenesis in endothelial cells by shuttling specific mRNA-derived EVs associated with the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway, therefore, inducing angiogenic responses (31).

Further investigations have demonstrated that delivery of mRNAs was not restricted to MVs but could be extended to exosomes derived from mast cells (32) and could be translated once after entering another cell (32–34). Furthermore, detailed RNA analysis of total RNAs derived from EVs from various cell types also revealed the presence of small RNAs, including microRNAs (miRNA) (32, 35, 36). Transfer of miRNAs contained in exosomes derived from dendritic cells operates via fusion of cells, leading to the release of the exosomes content into the dendritic cell cytosol (37).

Numerous clinical studies have revealed that cardiovascular diseases correspond with specific signature patterns of miRNA expression (38, 39). Circulating EVs represent transport vehicles for large numbers of specific miRNAs involved in fundamental cellular processes related to cardiovascular disorders (40). Importantly, the comparison of ratio of miRNA expression in circulating EVs to that in EV-free plasma reveals the majority of circulating miRNAs were present in EVs (41). Since miRNA profile in EVs is significantly different from their maternal cells, an active mechanism of selective “packaging” from cells into EVs likely occurs. Of note, molecular packaging of miRNA-loaded exosomes is controlled through the recognition of sequence motifs present in miRNAs by sumoylated protein hnRNPA2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1) (42). Moreover, this compartmentalization may be regulated by external stimuli as illustrated by hypoxia, which can modulate immunomodulatory and regenerative properties of MSC-derived EVs (16) but also enhanced expression of pro-angiogenic miRNAs in EPC-derived EVs (43).

MiRNAs contained in EVs might efficiently regulate target genes in recipient cells as illustrated with monocyte miRNA-150, selectively packaged into EVs following treatments of human monocyte/macrophage THP1 cells with inflammatory factors (41). By the use of THP-1-derived EVs expressing a mimic miR-150, the authors showed elevated miR-150 levels in *in vitro* EV-treated endothelial cells as well as in mouse blood vessels following EV intravenous injection. Consequently, protein level of c-Myb, a gene targeted by miR-150, is effectively reduced resulting in enhanced endothelial cell migration. This monocyte/macrophage EVs delivery system has been further optimized by transfecting donor cells with a chemically modified miRNA (miR-143), which revealed higher stability (44).

MiR-126, an important regulator of angiogenesis and vascular integrity (45, 46) is enriched in different types of EVs, such as apoptotic bodies derived from endothelial cells (47), endothelial microparticles (48), or even EPCs (49). In agreement with the striking evidence describing the role of miR-126 in the regulation of vascular integrity on the molecular level, treatment with these different types of miR-126-enriched EVs all promote vascular regeneration. Indeed, systemic treatment of hypercholesterolemic ApoE<sup>-/-</sup> mice with miR-126-enriched EVs limited atherosclerosis and increased Sca1<sup>+</sup> cell incorporation into aortic plaques (47) whereas miR-126-associated EVs promote reendothelialization *in vivo* (48). Alternatively, both angiogenic miR-126 and miR-296 participate in the improvement of neovascularization observed in a model of hindlimb ischemia induced in SCID mice following treatment with EPC-derived EVs (49). Of particular interest, miRNA profiling in patients with coronary artery disease

has shown significantly reduced levels of miR-126 in comparison with healthy controls (50) or even total loss circulating miR-126 in patients with diabetes mellitus (39). Therefore, development of EV-based miR-126 therapeutic strategy might be promising in the context of metabolic and cardiovascular diseases.

Our group has developed one type of EVs carrying the morphogen Shh that reveals protective properties on cardiovascular cells. The next part of this review is focused on the description of the effects of these EVs.

## EVs HARBORING Shh AS VASCULAR AND CARDIO-PROTECTIVE DELIVERY TOOLS

### IMPORTANCE OF Shh SIGNALING IN VASCULAR FUNCTION

Shh is a morphogen that belongs to the conserved hedgehog (Hh) protein family. Hedgehog signaling is essential in vertebrates for embryo patterning, as it participates in central nervous system development, lateral asymmetry, and anterior–posterior limb axis (51). In adult tissues, Shh signaling has been implicated in cell proliferation, differentiation, and survival in a wide variety of target tissues/organs [reviewed in detail in Ref. (52)]. Hh proteins are covalently linked to cholesterol at its carboxyl terminus (53) and palmitoylated at its amino terminus (54). Both lipid modifications influence activities of Shh (55, 56) and long-range spread of Shh signaling (57, 58). Diffusion of dual-lipid modified Shh proteins apparently occurs via secretion as mono or large soluble multimers, further transported via lipoproteins (59) or in EVs (60–62). A major component of the Hh pathway includes the 12 transmembrane receptor PTC (Patched) that constitutively represses Hh signaling. Binding of Shh to PTC inhibits the repression of Smoothened (SMO), which functions as G protein-coupled receptor (GPCR). This derepression leads to the activation of zinc-fingers transcription factors Gli, which translocate to the nucleus where they act as activators or repressors of target gene transcription. Besides this classical–Shh signaling pathway, referred as “canonical pathway,” other non-canonical pathways that do not clearly act via the Shh–Smo–Gli axis have been reported, which regulate many cellular processes including cell energy metabolism (63, 64).

Shh signaling is crucial in new vessel formation during embryogenesis and organogenesis. Its role in angiogenesis and neovascularization has been previously reviewed in details (65). Hh signaling components are present in adult cardiovascular tissues and can be activated *in vivo* (66). In adult tissue, activation of Shh signaling, via recombinant Shh or gene-therapy transfer, triggers cellular responses in a wide variety of vascular cells (endothelial, EPCs, smooth muscle cells, fibroblasts) promoting angiogenesis and protecting against ischemic injuries (66–68). These Shh effects on cardiovascular system seem to operate via complex pathways, involving Gli-dependent and independent pathways (Figure 2A).

Endothelial cells were initially considered not to respond to recombinant Shh directly, but rather to rely on adjacent mesenchymal cells thought to translate the presence of Hh ligand in signaling molecules that act on the endothelium (66). Particularly, activation of Shh signaling in interstitial mesenchymal cells enhances PTC, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), and angiopoietin-1 and -2 protein expressions (66). Further studies demonstrate that endothelial cells do respond to Hh inducing pro-angiogenic

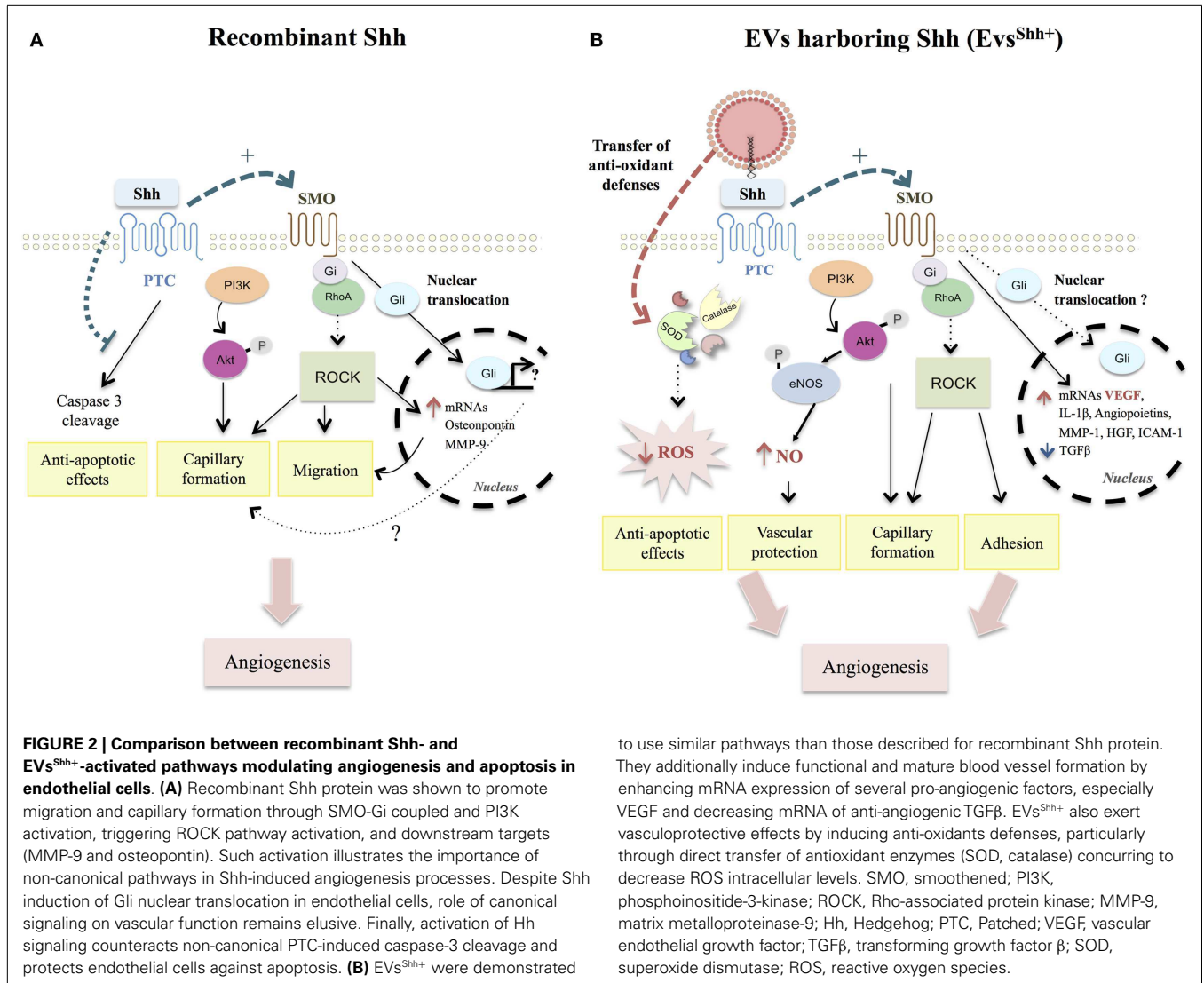
responses (69, 70). PI3K/Akt and SMO dependencies have been demonstrated to be essential for Shh signaling (71, 72). In agreement, Shh acutely stimulates fibroblast migration and endothelial cell tubulogenesis through Rho GTPases Rac1 and RhoA activation depending on SMO–G(i)–coupling and PI3K, but independently of Gli transcription factors (69, 73). Similarly, Shh promotes capillary morphogenesis and endothelial cell migration via a RhoA/ROCK dependent pathway, ultimately leading to increased expression of metalloproteinase 9 (MMP-9) or osteopontin downstream targets (74). Despite Gli nucleus translocation following Shh treatment of endothelial cells, role of these transcription factors in Shh-angiogenesis responses is not fully understood (71). Controversy regarding Shh signaling is also present *in vivo* since Shh-induced angiogenesis is not affected in Gli1 null-mice (74), whereas capillaries morphogenesis is inhibited by the presence of Gli1 inhibitor GANT61 (70). Impaired angiogenesis in ischemic tissue of middle-aged or old mice is associated with a decrease in Gli1 transcription factor mRNA expression (68, 75). These results reflect the complex interplay between canonical and non-canonical Shh pathways, or at least that of the Gli family of transcription factors, in the regulation of tubulogenesis and angiogenesis processes.

### EVs HARBORING Shh AS PROMISING THERAPEUTICAL DEVICES FOR CORRECTING ANGIOGENIC DEFECTS

Shh beneficial effects in angiogenesis reveal therapeutic potential for stimulating neovascularization in disease states associated with impaired angiogenesis. This has led our group to engineer EVs specifically enriched in this morphogen and derived from activated T-lymphocytic cells. EVs<sup>Shh+</sup> are specifically retrieved from conditioned medium when lymphocytes are treated with a proactive stimulation, phytohemagglutinin, and phorbol ester, followed by a pro-apoptotic treatment with actinomycin D (62). These EVs<sup>Shh+</sup> are functionally active and induce differentiation of megakaryocytes. EVs<sup>Shh+</sup> downstream effects likely depend on SMO activation, probably acting through direct Shh–PTC interaction (see Figure 2B). *In vitro* capillary formation by umbilical vein endothelial cells is both dependent on EVs<sup>Shh+</sup> concentration and inhibited in presence of cyclopamine, which stabilizes SMO in an inactive form (76). However, whether EVs<sup>Shh+</sup> induce activation of Gli1 remain to be determined. *In vitro*, EVs<sup>Shh+</sup> increase mRNA levels of several pro-angiogenic factors, such as VEGF, angiopoietins, hepatocyte growth factor (HGF), interleukin-1 $\beta$ , MMP-1 and decrease anti-angiogenic factors such as transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) (76). EVs<sup>Shh+</sup> also increase cell adhesion and induce formation of stress fibers of *in vitro* endothelial cells in a SMO and Rho kinase pathways-dependent manner (76), likely signaling through the same pathway as described for recombinant Shh (69).

Angiogenic properties of EVs<sup>Shh+</sup> have been illustrated following their *in vivo* intravenous injection in mouse models (77). *In vivo* injection of EVs<sup>Shh+</sup> in mice is able to improve endothelial function by increasing nitric oxide (NO) release and reversing endothelial dysfunction after ischemia/reperfusion (78). Indeed, EVs<sup>Shh+</sup> trigger changes in the expression and phosphorylation of enzymes related to NO pathway, which seem to be dependent of the activation of kinases such as PI3K and ERK. Furthermore, 21 day-treatment of a model of mouse hind limb ischemia





with EVs<sup>Shh+</sup> increase eNOS activation both in aorta and muscle as well as several pro-angiogenic factors (77). Taken together, lymphocytic-derived EVs<sup>Shh+</sup> are able to induce functional and mature blood vessel formation by reciprocally regulating the pro- and anti-angiogenic factors.

Apart from directly stimulating angiogenesis processes, EVs<sup>Shh+</sup> reveal anti-apoptotic properties notably by decreasing reactive oxygen species (ROS) production (78). Mechanistically, EVs<sup>Shh+</sup> exert their vasculoprotective effects by promoting internalization and induction of antioxidant messages to the endothelial monolayer. Indeed, EVs<sup>Shh+</sup> prevent apoptosis in endothelial cells induced by actinomycin D by transferring functional antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD) isoforms and catalase] and by inducing cellular Mn-SOD protein expression (79). Anti-apoptotic effects have also been reported following Hh ligand treatment of endothelial cells, but rather relying on the inhibition of the pro-apoptotic effect of PTC, normally leading to caspase-3 cleavage (69).

to use similar pathways than those described for recombinant Shh protein. They additionally induce functional and mature blood vessel formation by enhancing mRNA expression of several pro-angiogenic factors, especially VEGF and decreasing mRNA of anti-angiogenic TGFβ. EVs<sup>Shh+</sup> also exert vasculoprotective effects by inducing anti-oxidant defenses, particularly through direct transfer of antioxidant enzymes (SOD, catalase) concurring to decrease ROS intracellular levels. SMO, smoothened; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; ROCK, Rho-associated protein kinase; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; Hh, Hedgehog; PTC, Patched; VEGF, vascular endothelial growth factor; TGFβ, transforming growth factor β; SOD, superoxide dismutase; ROS, reactive oxygen species.

Therefore, EVs<sup>Shh+</sup> may represent a powerful tool in diseases associated with failed angiogenesis, associated with their pro-angiogenic and anti-apoptotic properties. In addition to observed differences in regulated pathways, structural features of Shh associated with EVs might be of particular importance. EVs provide a lipidic environment analogous to cell membrane, which could influence Shh downstream signaling considering the importance of these lipid-adducts in Shh activity (57, 58). Finally, EV-delivery of Shh protein seems to represent a major mechanism in the observed preservation of cardiac function in stem cell-based therapies. Indeed, CD34<sup>+</sup> cells genetically modified to express Shh [CD34<sup>+</sup>(Shh)] offer a better protection against ventricular dilation and cardiac functional decline than CD34<sup>+</sup> cells alone when injected into mice after acute myocardial infarction (80). *In vitro* analysis of exosomes derived from CD34<sup>+</sup>(Shh) further revealed the functional transfer and activation of Shh signaling in recipient cells, which might explain the observed preservation of cardiac function in mice treated with CD34<sup>+</sup> (Shh) EVs.



Thus, EVs harboring Shh represent an exciting tool for therapy regarding angiogenesis defects related diseases and cardioprotection.

### TOWARD CLINICAL TRANSLATION

Extracellular vesicles might be further used as delivery devices for any molecule of interest. In particular, using naturally occurring secreted vesicles might allow overcoming toxicity or immunogenicity associated with other developed carrying agents like liposomes or nanoparticles. Moreover, this new drug-delivery system might be combined with other existing therapeutic strategies to optimize drug-delivery. Indeed, a recent report demonstrates that adeno-associated viruses (AAVs) are more efficient when encapsulated in EVs (termed vexosomes) than free AAVs for the delivery of cargo into recipient cells. Such a unique entity offers a promising strategy to improve gene delivery (81). Alternatively, tumor cells incubated with chemotherapeutic drugs are able to package these drugs into EVs, which can be collected and used to effectively kill tumor cells in murine tumor models without typical side effects (82).

Furthermore, the use of biological material as carriers might also allow getting molecules in their native conformation, due to natural interaction or folding with membranous environment. Different strategies might be used to specifically target molecules in EVs. For example, addition of different types of membrane anchors can target highly oligomeric cytoplasmic proteins to sites of vesicle secretion and EVs (83). Another important issue is the biodistribution of EVs. Indeed, EVs are circulating through many fluids, and have been especially recovered from blood or lymph, therefore allowing their large dissemination in the organism. Such circulating properties are of particular interest in the treatment of cardiovascular alterations since the entire vascular network would be exposed to EVs. Since dissemination or accumulation of these biological vectors may also be hindered, one could need to specifically target cargo delivery to enhance EV properties. Elegant studies using engineering donor cells expressing peptide targeting-ligand subsequently recovered in EVs produced by cells have respectively allowed to specifically target neurons (84) and breast cancer cells (85).

Despite interesting perspectives for cardiovascular treatment, EV-based therapies still need more investigations to translate into clinical studies. Lessons from the ongoing exosome-based preliminary clinical trials in the field of cancer would certainly boost such therapeutic perspectives. Particularly, one challenge would be to control the fragile balance between the harmful effects and beneficial ones reported for EVs in the context of cardiovascular diseases. However, cardiovascular field would undoubtedly benefit from optimized developed methods for large-scale production of clinical grade EVs derived from MSC (27) or dendritic cells (86).

By inhibiting their deleterious effects, by taking advantage of their regenerative properties or by developing EV-based drug-delivery tools, targeting EVs reveal all the exciting opportunities to treat cardiovascular alterations by non-immunogenic means. In particular, EVs carrying Shh<sup>+</sup> represent interesting tools to treat diseases related to failed NO pathway and impaired angiogenesis.

### ACKNOWLEDGMENTS

Soazig Le Lay is funded by a grant from ANR, MilkChEST n° ANR-12-BSV6-0013-04 and by a grant from “Région Pays de la Loire”. Audrey Fleury received a Ph.D fellowship from “Région Pays de la Loire”.

### REFERENCES

- van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* (2012) **64**:676–705. doi:10.1124/pr.112.005983
- Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* (2013) **2**:20360. doi:10.3402/jev.v2i0.20360
- Gaceb A, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol* (2014) **50**:24–8. doi:10.1016/j.biocel.2014.01.018
- Schiro A, Wilkinson FL, Weston R, Smyth JV, Serracino-Inglott F, Alexander MY. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* (2014) **234**:295–302. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.019
- Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, et al. Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J* (2014). doi:10.1093/eurheartj/ehu153
- Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* (2011) **32**:659–65. doi:10.1016/j.tips.2011.06.005
- El Andaloussi S, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* (2013) **12**:347–57. doi:10.1038/nrd3978
- Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* (2010) **120**:457–71. doi:10.1172/JCI40483
- Loyer X, Vion AC, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res* (2014) **114**:345–53. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300858
- Smalheiser NR. Do neural cells communicate with endothelial cells via secretory exosomes and microvesicles? *Cardiovasc Psychiatry Neurol* (2009) **2009**:383086. doi:10.1155/2009/383086
- Mostefai HA, Agouni A, Carusio N, Mastronardi ML, Heymes C, Henrion D, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *J Immunol* (2008) **180**:5028–35. doi:10.4049/jimmunol.180.7.5028
- Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* (2005) **33**:2540–6. doi:10.1097/01.CCM.0000186414.86162.03
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* (2003) **9**:1195–201. doi:10.1038/nm912
- Gnecchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol* (2012) **57**:48–55. doi:10.1016/j.vph.2012.04.002
- Ratajczak MZ, Kucia M, Jadczyk T, Greco NJ, Wojakowski W, Tendra M, et al. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia* (2012) **26**:1166–73. doi:10.1038/leu.2011.389
- Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* (2005) **11**:367–8. doi:10.1038/nm0405-367
- Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* (2006) **20**:661–9. doi:10.1096/fj.05-5211.com

18. Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hoefler IE, Doevendans PA, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* (2007) **1**:129–37. doi:10.1016/j.scr.2008.02.002
19. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* (2010) **4**:214–22. doi:10.1016/j.scr.2009.12.003
20. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Agur EN, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* (2013) **10**:301–12. doi:10.1016/j.scr.2013.01.002
21. Sahoo S, Klychko E, Thorne T, Misener S, Schultz KM, Millay M, et al. Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* (2011) **109**:724–8. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253286
22. Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F, Beltramo S, Medica D, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell Transplant* (2012) **21**:1305–20. doi:10.3727/096368911X627534
23. Vrijnsen KR, Sluijter JP, Schuchardt MW, Van Balkom BW, Noort WA, Chamuleau SA, et al. Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. *J Cell Mol Med* (2010) **14**:1064–70. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01081.x
24. Chen L, Wang Y, Pan Y, Zhang L, Shen C, Qin G, et al. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) **431**:566–71. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.015
25. Barile L, Gherghiceanu M, Popescu LM, Moccetti T, Vassalli G. Ultrastructural evidence of exosome secretion by progenitor cells in adult mouse myocardium and adult human cardiospheres. *J Biomed Biotechnol* (2012) **2012**:354605. doi:10.1155/2012/354605
26. Chaput N, They C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol* (2011) **33**:419–40. doi:10.1007/s00281-010-0233-9
27. Chen TS, Arslan F, Yin Y, Tan SS, Lai RC, Choo AB, et al. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *J Transl Med* (2011) **9**:47. doi:10.1186/1479-5876-9-47
28. Fonsato V, Collino F, Herrera MB, Cavallari C, Deregibus MC, Cisterna B, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs. *Stem Cells* (2012) **30**:1985–98. doi:10.1002/stem.1161
29. Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett* (2012) **315**:28–37. doi:10.1016/j.canlet.2011.10.002
30. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* (2006) **20**:847–56. doi:10.1038/sj.leu.2404132
31. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* (2007) **110**:2440–8. doi:10.1182/blood-2007-03-078709
32. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* (2007) **9**:654–9. doi:10.1038/ncb1596
33. Skog J, Wurdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* (2008) **10**:1470–6. doi:10.1038/ncb1800
34. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, De Paz N, Dooner MS, Puente N, et al. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol* (2010) **38**:233–45. doi:10.1016/j.exphem.2010.01.002
35. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* (2010) **5**:e11803. doi:10.1371/journal.pone.0011803
36. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* (2011) **2**:282. doi:10.1038/ncomms1285
37. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* (2012) **119**:756–66. doi:10.1182/blood-2011-02-338004
38. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* (2007) **31**:367–73. doi:10.1152/physiolgenomics.00144.2007
39. Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ Res* (2012) **110**:508–22. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247445
40. Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* (2012) **93**:633–44. doi:10.1093/cvr/cvs007
41. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* (2010) **39**:133–44. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.010
42. Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* (2013) **4**:2980. doi:10.1038/ncomms3980
43. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int* (2012) **82**:412–27. doi:10.1038/ki.2012.105
44. Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, et al. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Mol Ther* (2011) **19**:395–9. doi:10.1038/mt.2010.254
45. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* (2008) **15**:272–84. doi:10.1016/j.devcel.2008.07.008
46. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, Mcanally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* (2008) **15**:261–71. doi:10.1016/j.devcel.2008.07.002
47. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* (2009) **2**:ra81. doi:10.1126/scisignal.2000610
48. Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, et al. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation* (2013) **128**:2026–38. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001720
49. Raghino A, Cantaluppi V, Grange C, Vitillo L, Fop F, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles improve neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Int J Immunopathol Pharmacol* (2012) **25**:75–85.
50. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* (2010) **107**:677–84. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215566
51. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. *Nature* (1996) **383**:407–13. doi:10.1038/383407a0
52. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* (2001) **15**:3059–87. doi:10.1101/gad.938601
53. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, Von Kessler DP, Young KE, Chen CH, et al. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* (1996) **86**:21–34. doi:10.1016/S0092-8674(00)80074-4
54. Chen X, Tukachinsky H, Huang CH, Jao C, Chu YR, Tang HY, et al. Processing and turnover of the hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* (2011) **192**:825–38. doi:10.1083/jcb.201008090
55. Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, Von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA, et al. Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* (2001) **293**:2080–4. doi:10.1126/science.1064437

56. Cooper MK, Wassif CA, Krakowiak PA, Taipale J, Gong R, Kelley RI, et al. A defective response to hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet* (2003) **33**:508–13. doi:10.1038/ng1134
57. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, et al. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* (2001) **105**:599–612. doi:10.1016/S0092-8674(01)00369-5
58. Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* (2004) **18**:641–59. doi:10.1101/gad.1185804
59. Briscoe J, Thérond PP. The mechanisms of hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2013) **14**:416–29. doi:10.1038/nrm3598
60. Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N. FGF-induced vesicular release of sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* (2005) **435**:172–7. doi:10.1038/nature03494
61. Liegeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* (2006) **173**:949–61. doi:10.1083/jcb.200511072
62. Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, et al. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* (2006) **108**:3012–20. doi:10.1182/blood-2006-04-019109
63. Ruat M, Hoch L, Faure H, Rognan D. Targeting of smoothened for therapeutic gain. *Trends Pharmacol Sci* (2014) **35**:237–46. doi:10.1016/j.tips.2014.03.002
64. Teperino R, Aberger F, Esterbauer H, Riobo N, Pospisilik JA. Canonical and non-canonical hedgehog signalling and the control of metabolism. *Semin Cell Dev Biol* (2014). doi:10.1016/j.semcdb.2014.05.007
65. Soleti R, Martinez MC. Sonic hedgehog on microparticles and neovascularization. *Vitam Horm* (2012) **88**:395–438. doi:10.1016/B978-0-12-394622-5.00018-3
66. Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, et al. The morphogen sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* (2001) **7**:706–11. doi:10.1038/89083
67. Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, et al. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med* (2005) **11**:1197–204. doi:10.1038/nm1313
68. Palladino M, Gatto I, Neri V, Straino S, Silver M, Tritarelli A, et al. Pleiotropic beneficial effects of sonic hedgehog gene therapy in an experimental model of peripheral limb ischemia. *Mol Ther* (2011) **19**:658–66. doi:10.1038/mt.2010.292
69. Chinchilla P, Xiao L, Kazanietz MG, Riobo NA. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* (2010) **9**:570–9. doi:10.4161/cc.9.3.10591
70. Spek CA, Bijlsma MF, Queiroz KC. Canonical hedgehog signaling drives pro-angiogenic responses in endothelial cells. *Cell Cycle* (2010) **9**:1683. doi:10.4161/cc.9.9.11653
71. Kanda S, Mochizuki Y, Suematsu T, Miyata Y, Nomata K, Kanetake H. Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* (2003) **278**:8244–9. doi:10.1074/jbc.M210635200
72. Riobo NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP Jr. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**:4505–10. doi:10.1073/pnas.0504337103
73. Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR, Riobo NA. Heterotrimeric Gi proteins link hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem* (2011) **286**:19589–96. doi:10.1074/jbc.M110.197111
74. Renault MA, Roncalli J, Tongers J, Thorne T, Klyachko E, Misener S, et al. Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* (2010) **49**:490–8. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.05.003
75. Renault MA, Robbesyn F, Chapouly C, Yao Q, Vandierdonck S, Reynaud A, et al. Hedgehog-dependent regulation of angiogenesis and myogenesis is impaired in aged mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2013) **33**:2858–66. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302494
76. Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles harboring sonic hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* (2009) **30**:580–8. doi:10.1093/carcin/bgp030
77. Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles carrying sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* (2010) **5**:e12688. doi:10.1371/journal.pone.0012688
78. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, et al. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J* (2007) **21**:2735–41. doi:10.1096/fj.07-8079.com
79. Soleti R, Laurent E, Andriantsitohaina R, Carmen Martinez M. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med* (2012) **53**:2159–70. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.021
80. Mackie AR, Klyachko E, Thorne T, Schultz KM, Millay M, Ito A, et al. Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ Res* (2012) **111**:312–21. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.266015
81. Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, Crommentuijn MH, Ericsson M, Mincheva-Nilsson L, et al. Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol Ther* (2012) **20**:960–71. doi:10.1038/mt.2011.303
82. Tang K, Zhang Y, Zhang H, Xu P, Liu J, Ma J, et al. Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles. *Nat Commun* (2012) **3**:1282. doi:10.1038/ncomms2282
83. Shen B, Wu N, Yang JM, Gould SJ. Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *J Biol Chem* (2011) **286**:14383–95. doi:10.1074/jbc.M110.208660
84. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakkhal S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* (2011) **29**:341–5. doi:10.1038/nbt.1807
85. Ohno S, Takashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther* (2013) **21**:185–91. doi:10.1038/mt.2012.180
86. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* (2013) **65**:336–41. doi:10.1016/j.addr.2012.07.001

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 24 June 2014; accepted: 18 July 2014; published online: 04 August 2014.

Citation: Fleury A, Martinez MC and Le Lay S (2014) Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front. Immunol.* **5**:370. doi: 10.3389/fimmu.2014.00370

This article was submitted to *Immunotherapies and Vaccines*, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2014 Fleury, Martinez and Le Lay. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Thèse de Doctorat

Audrey FLEURY

## Caractérisation et fonction des vésicules extracellulaires sur le métabolisme adipocytaire : rôle du morphogène Sonic Hedgehog

Molecular characterization and functions of extracellular vesicles on adipocyte metabolism: a role for the morphogen Sonic Hedgehog

### Résumé

Les vésicules extracellulaires (VE), incluant exosomes et microparticules (MP), vecteurs d'information biologique, peuvent moduler la fonction de cellules cibles. Une élévation du taux de VE circulantes est observée dans les pathologies cardiovasculaires dont l'obésité est l'un des facteurs de risque majeur. Cependant, il existe peu de données concernant la production de VE adipocytaires et leur capacité à moduler le métabolisme des adipocytes. Tout d'abord, nous avons caractérisé de manière morphologique et biochimique les MP et les exosomes adipocytaires. Nous montrons une production accrue de ces VE dans un contexte d'obésité murine. L'analyse protéomique des VE adipocytaires révèle un enrichissement spécifique des MP et des exosomes en protéines clé du métabolisme énergétique et de l'inflammation, respectivement. Dans une seconde partie, nous avons étudié l'effet de MP lymphocytaires portant le morphogène Hedgehog ( $MP^{Hh+}$ ) sur la différenciation adipocytaire. A l'instar d'une activation classique de la voie de signalisation Hh, les  $MP^{Hh+}$  inhibent l'adipogenèse. Bien que dépendant du récepteur Smoothed (Smo), cet effet inhibiteur est indépendant des facteurs de transcription Gli. Nous montrons que les  $MP^{Hh+}$  activent un axe anti-adipogénique Smo/Lkb1/Ampk pouvant être stimulé par un nouvel agoniste de Smo, le GSA-10. Nos résultats démontrent, d'une part, la capacité des adipocytes à sécréter des VE, et d'autre part, le potentiel fonctionnel des  $MP^{Hh+}$  à inhiber l'adipogenèse par une voie de signalisation Hh non-canonique. Les VE pourraient contribuer aux dysfonctions métaboliques associées à l'obésité en véhiculant des messages métaboliques à l'échelle de l'organisme.

### Mots clés

Vésicules extracellulaires, exosomes, microparticules, adipocyte, sonic hedgehog, remodelage tissu adipeux

### Abstract

Extracellular vesicles (EV), including microparticles (MP) and exosomes, are able to modulate target cell function through exchange or transfer of biological material. Although EV are present in the blood of healthy individuals, an elevated quantity of circulating EV is associated with cardiovascular diseases, which obesity is a major cardiovascular risk factor. Nevertheless, few studies have reported the ability of adipocytes to release EV and their implication in adipose tissue metabolism. First of all, we could determine morphological and biochemical features of adipocyte-derived exosomes and MP through a combination of methods. We were able to demonstrate an increase in adipocyte EV production in a murine model of obesity. Proteomic analysis of adipocyte EV further revealed a specific enrichment of proteins crucial for glucose and lipid metabolism and related to inflammation in MP and exosomes respectively. We then evaluated the ability of lymphocytes-derived MP harboring the Sonic Hedgehog morphogen to control adipocyte differentiation. Activation of the Hedgehog canonical pathway inhibited adipogenesis, as did  $MP^{Hh+}$ . Surprisingly, although Smo dependent, inhibitory potential of such MP did not involve the Gli transcription factors. We show that  $MP^{Hh+}$  inhibit adipocyte differentiation through a Smo/Lkb1/Ampk axis as does a new agonist of Smo, GSA-10. Our results demonstrate, on one hand, the ability of adipocyte to release EV and on the other hand, the capacity of  $MP^{Hh+}$  to control adipogenesis through a non-canonical Hh signaling pathway. In conclusion, EV might contribute to obesity-related metabolic dysfunctions through systemic regulation of metabolic pathways.

### Key Words

Extracellular vesicles, exosomes, microparticles, adipocyte, Sonic Hedgehog, adipose tissue remodeling