

RICHARD CHEBBABI

**EFFET DU VIP SUR LA MODULATION DES
RÉPONSES DES CELLULES DENDRITIQUES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en microbiologie-immunologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE-INFECTIOLOGIE ET D'IMMUNOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Les cellules dendritiques (CDs) sont des cellules présentatrices d'antigènes agissant comme messagers entre l'immunité innée et adaptative. Elles sont activées par des molécules endogènes : *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) ou exogènes : *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Ces molécules modulent l'expression des récepteurs à la surface des CDs, la production de cytokines et la libération d'exosomes dans le milieu extracellulaire. De plus, il est connu que le neuropeptide *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP) réduit l'activation des CDs par des PAMPs.

Mon projet vise à étudier si l'activation des CDs par des DAMPs peut aussi être régulée par le VIP. Les résultats obtenus montrent que des DAMPs (ex : cristaux d'urate monosodique) et des PAMPs (ex : Lipopolysaccharide : LPS) provoquent une activation des CDs qui est diminuée en présence de VIP. Nous observons également que ce peptide diminue la production de cytokines et la quantité d'exosomes dans le milieu extracellulaire en réponse aux cristaux d'urate monosodique. Le VIP régule l'activation des CDs par des DAMPs ainsi que la production d'exosomes.

Abstract

Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells that act as messengers between innate and adaptive immunity. They are activated by endogenous : *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) and exogenous : *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) particles. These molecules modulate the expression of receptors on the surface of DCs, cytokine production and release of exosomes into the extracellular medium. In addition, the neuropeptide *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP) reduces the activation of DCs by PAMPs.

My project is to investigate if the activation of DCs by DAMPs can also be regulated by VIP. The results show the DAMPs ex : *monosodium urate crystals* and the PAMPs (ex : Lipopolysaccharide : LPS) cause an activation of DCs but that this activation is reduced in the presence of VIP. We observed that this peptide also reduces cytokine production and the production of exosomes in the extracellular medium in response to monosodium urate crystals. VIP regulates therefore the activation of DCs by DAMPs and the production of exosomes.

À mes grands-parents,

À mes parents,

À mes frères,

À Élahé

Avant-Propos

Ce travail de maîtrise a été effectué au centre de recherche en Infectiologie et Immunologie de l'Université Laval.

Je tiens à remercier Dre Caroline Gilbert d'avoir accepté de diriger mon travail de recherche, pour son expertise, pour ses conseils et pour sa grande disponibilité.

Mon passage dans son laboratoire m'a permis d'acquérir plus d'autonomie et d'expérience, et m'a donné un aperçu plus large sur le monde réel de la recherche fondamentale. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Également, je tiens à remercier les membres du jury : Dr Jean Sévigny et Dr Paul Naccache, pour leur intérêt et pour avoir accepté de corriger mon mémoire.

Je remercie aussi les membres de mon laboratoire, ainsi que les étudiants et les stagiaires : Mr Sébastien Simard, Mlle Aliona Bancila, Mlle Julie Andrea Chapeton Montes, Mlle Audrey Laroche, Mlle Sophie Proulx, Mlle Gabrielle Beaulieu Carbonneau, Dre Caroline Subra et Dre Alexandra Lambert pour leur aide apportée dans la réalisation de mon projet.

Mes remerciements vont également à Élahé, qui m'accompagne avec tant de bonheur depuis quelques mois. C'est une joie pour moi de l'avoir rencontré et de la connaître.

Enfin mes dernières pensées vont à mes grands parents qui m'ont malheureusement quitté et elles vont à mes parents et à mes frères qui ont toujours été là pour moi.

"N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès. Essayez de devenir un homme qui a de la valeur. "

Albert Einstein

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Avant-Propos	VI_Toc303171751
Table des matières	VIII
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures	XI
Liste des abréviations.....	XIII
CHAPITRE I – Introduction.....	1
I.1. Le neuropeptide VIP.....	1
I.1.1 Récepteurs du VIP.....	2
I.1.2 Les fonctions du VIP.....	8
I.2. Signaux de dangers endogènes et UMS.....	15
I.2.1 Définitions des signaux de dangers.....	15
I.2.2 Les cristaux d’UMS	18_Toc303171764
I.3. Les exosomes.....	21
I.3.1 Caractérisation des exosomes	21
I.3.2 Fonctions des exosomes.....	24
CHAPITRE II – Hypothèses de travail.....	29
CHAPITRE III – Matériels et Méthodes	31
III.1 Les réactifs	31
III.2 Les anticorps	31
III.3 Cellules, stimulations et traitements	32
III.3.1 PBMC	32
III.3.2 CDs.....	32
III.4 Cytométrie en flux.....	33
III.5 Isolement des exosomes.....	33
III.6 Immunobuvardage.....	33
III.7 Dosage des cytokines pro-inflammatoires	34

III.7.1 Lignée indicatrice HEK-Blue™ TNF α /IL1 β	34
III.7.2 ELISA TNF α	35
III.8 Analyses statistiques	35
CHAPITRE IV – Résultats	36
IV.1 Impact du VIP sur l'activation des CDs en présence de LPS et d'IFN γ	36
IV.1.1 Effet du VIP sur la maturation de CDs activées avec du LPS et de l'IFN γ	36
IV.1.2 Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β actives par des CDs à la suite d'une stimulation au LPS et à l'IFN γ	38
IV.2 Impact du VIP sur l'activation des CDs en présence de cristaux d'UMS	41
IV.2.1 Effet du VIP sur la maturation des CDs activées avec des cristaux d'UMS.....	41
IV.2.2 Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β actives par des PBMC et des CDs à la suite d'une stimulation aux cristaux d'UMS	43
IV.3 Quantification et caractérisation des exosomes	46
IV.3.1 Quantification des exosomes produits par des CDs stimulées avec des cristaux d'UMS et traitées avec du VIP	46
IV.3.2 Caractérisation des exosomes produits par des CDs stimulées avec des cristaux d'UMS et traitées avec du VIP	48
CHAPITRE V – Discussions	50
V.1 Effets du VIP sur l'activation des CDs stimulées en présence de PAMPS :	50
V.2 Modulation par le VIP de l'activation de CDs stimulées en présence de DAMPS :	51
V.3 Effets du VIP et des cristaux d'UMS sur la production des exosomes et leurs caractérisations :	52
CHAPITRE VI – Conclusions et Contributions du projet.....	55
CHAPITRE VII – Perspectives	57
VII.1 Rôles possibles du VIP et des signaux de danger dans le contexte d'une infection :	58
VII.1.1 Rôles des CDs et rôle possible du VIP lors d'une infection au VIH-1 :	58
VII.1.2 Rôles des récepteurs du VIP dans l'infection par le VIH-1 :	59
VII.1.3 Rôles possibles des PAMPS, des DAMPS et du VIP dans la déplétion des LT-CD4+ :	63
CHAPITRE VIII - Références	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : Présence des récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 dans les cellules du système immunitaire et les cellules apparentées [44].....	5
---	---

Liste des figures

Figure 1 : Voies de signalisations des récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1	6
Figure 2 : Modèle d'activation du système immunitaire par les PAMPS et DAMPS	16
Figure 3 : Molécules de signaux de dangers endogènes DAMPS, libérées à la suite d'un endommagement tissulaire et/ou une nécrose des cellules	17
Figure 4 : Mécanismes d'activations du système immunitaire par les cristaux d'UMS.	19
Figure 5 : Impact des cristaux d'UMS et du LPS sur la maturation des CD8	20
Figure 6 : Biogenèse des exosomes	22
Figure 7 : Compositions des exosomes	23
Figure 8 : Augmentation de la quantité d'exosomes produits par des CD8 à la suite d'une stimulation par des cristaux d'UMS	26
Figure 9 : Détection de la protéine DAP3 dans les exosomes de CD8 stimulées aux cristaux d'UMS	27
Figure 10 : Quelques voies de signalisation déclenchées à la suite de la fixation de TRAIL sur son récepteur.....	28
Figure 11 : Effet du VIP sur la maturation des CD8 à la suite d'une stimulation avec du LPS et de l'INF γ	37
Figure 12 : Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β par des CD8 à la suite d'une stimulation avec du LPS et de l'INF γ	39
Figure 13 : Effet du VIP sur la production de TNF α par des CD8 à la suite d'une stimulation avec du LPS et de l'INF γ	40
Figure 14 : Effet du VIP sur la maturation des CD8 à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS.....	42
Figure 15 : Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β par des PBMC à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS	44

Figure 16 : Effet du VIP sur la production de TNF α par des CDs à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS.....	45
Figure 17 : Effet du VIP sur la production d'exosomes par des CDs à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS.....	47
Figure 18 : Effet du VIP sur la présence de la protéine DAP3 dans les exosomes produits par des CDs à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS	49
Figure 19 : Rôles des récepteurs VPAC1 et VPAC2 dans la <i>cis</i> -infection au VIH-1, et hypothèses	62
Figure 20 : Endoscopie du tractus gastro-intestinal 15 jours après le début de l'infection au VIH-1	63
Figure 21 : Facteurs susceptibles d'être impliqués dans la déplétion des LT-CD4+ du GALT	64

Liste des abréviations

AC : Adénylyl Cyclase

AICD : Activation-Induced Cell Death (Mort cellulaire induite par activation)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AP-1 : Activator Protein 1 (Protéine activatrice 1)

Apaf-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 (Facteur peptidase d'activation 1)

APO2L : APO2 Ligand (Ligand APO2)

ARF : ADP-Ribosylation Factor (Facteur de ribosilation d'ADP)

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

[Ca²⁺]_i : Calcium intracellulaire

CCL2 : Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (Ligand de la chimiokine 2 (motif C-C))

CCL3 : Chemokine (C-C motif) Ligand 3 (Ligand de la chimiokine 3 (motif C-C))

CCL4 : Chemokine (C-C motif) Ligand 4 (Ligand de la chimiokine 4 (motif C-C))

CCL5 : Chemokine (C-C motif) Ligand 5 (Ligand de la chimiokine 5 (motif C-C))

CCL20 : Chemokine (C-C motif) ligand 20 (Ligand de la chimiokine 20 (motif C-C))

CCR : CC-Chemokine Receptor (Récepteur de la chimiokine CC)

CG : Complex Golgi (Appareil de Golgi)

CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité I

CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité II

CpG : unmethylated Cytosine-Guanine nucleotide repeats (Répétitions de nucleotides cytosine-guanine non méthylés)

CRE : cAMP Response Element (Élément de réponse à l'AMPc)

CREB : cAMP Response Element Binding (Élément de réponse liant l'AMPc)

CXCL1 : Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1 (Ligand de la chimiokine 1 (motif C-X-C))

CXCR : CXC-Chemokine receptor (Récepteur de la chimiokine CXC)

CyRE : Cytokine Response Element (Éléments de réponse aux cytokines)

DAP3 : Death Associated Protein 3 (Protéine associée à la mort 3)

DCIR : Dendritic Cell ImmunoReceptor (Immunorécepteurs des cellules dendritiques)

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (Molécules d'adhésion intracellulaire non-intégrine 3 spécifiques aux cellules dendritiques)

DTH : hypersensibilité de type retardé

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dosage immunoenzymatique lié à une enzyme)

FasL : CD95L

FasL : Fas Ligand (Ligand à FAS)

Fas receptor : CD95

FBS : Fetal Bovine Serum (Sérum fœtal bovin)

fMLP : N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine)

GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue (Tissu lymphoïde associé à l'intestin)

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Facteurs stimulant les colonies de granulocytes)

GHRH : Growth Hormone-Releasing Hormone (Hormone libérant les hormones de croissance)

GIP : Glucose-dependent Insulintropic Polypeptide (Polypeptide insulino-trope dépendant du glucose)

GLP : Glucagon-Like Peptide (Peptide ressemblant au glucagon)

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (Facteurs stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes)

GP120 : glycoprotéine d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine

GTP : Guanosine triphosphate

HMGB1 : High Mobility Group Box protein-1 (Protéine du groupe à haute mobilité, boîte 1)

IFN- γ : Interféron- γ

Ig : Immunoglobulines

IP3 : inositol triphosphate

IUPHAR : International Union of Pharmacology (Union internationale de Pharmacologie)
KO : knock-out (Déficiente)
LAMP2 : Lysosomal-associated membrane protein 2 (Protéine de la membrane lysosomale associée 2)
LB : Lymphocytes B
LSM : Lymphocyte Separation Medium (Milieu de séparation de lymphocytes)
LSP : Lymphocytes du sang périphérique
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases (Protéine kinase activée par les mitogènes)
 α -MSH : alpha-Melanocyte Stimulating Hormone (Protéines stimulant les alpha-mélanocytes)
MVBs : MultiVesicular Bodies (Corps multivésiculaires)
NALP3 : NAcht Leucine-rich repeat Protein 3 (Protéine NAcht riche en répétition de leucine 3)
Nef : HIV-1-Negative Factor (Facteur négatif du VIH-1)
NK : Natural Killer (Tueur naturel)
NO : Nitric Oxide (Oxide nitrique)
PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (Polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire)
PAM : Peptidyl glycine α -Amidating Monooxygenase (Peptidyl-glycine alpha-amidant monooxygénase)
PBS : Phosphate-Buffered Saline (Tampon phosphate salin)
PHI : Peptide Histidine Isoleucine
PHM : Peptide Histidine Methionine
PIP2 : phosphatidylinositol diphosphate
PKA : Protéine Kinase APLC : Phospholipase C
PLD : Phospholipase D
PKC : Protein Kinase C (Protéine Kinase C)
PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate
PRRs : Pattern Recognition Receptor (Récepteurs de reconnaissance de motifs)
PVDF : PolyVinylidèneFluoride
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RER : Rough Endoplasmic Reticulum (Réticulum endoplasmique rugueux)
SB5X : Sample Buffer 5X (Tampon d'échantillon 5X)
SEAP : Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (Phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée)
SIDA : Syndrome de l'immuno déficience acquise
Slp76 : Leukocyte-Specific Phosphoprotein of 76 kDa (Phosphoprotéine de 76 kDa spécifique aux Leucocytes)
SNC : Système Nerveux Central
TBS : Tris Buffer Saline (Solution saline de tampon Tris)
TCR : T Cell Receptor (Récepteur des cellules T)
Th2 : T helper (T auxiliaire)
TLR : Toll Like Receptors (Récepteur "Toll-Like")
TNF : Tumor Necrosis Factor (Facteurs de nécrose tumorale)
TNFR1 : TNF Receptor 1 TPA 12-O-tétra décanoylphorbol 13-acétate (Récepteurs des TNF TPA 12-O-tétra-acétate de 13 décanoylphorbol de type 1)
TPA : Esters de phorbol 12-O-tétra décanoylphorbol 13-acétate
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Ligand inducteur de l'apoptose apparenté au TNF)
TRE : TPA/PMA-Responsive Element (Élément de réponse au TPA/PMA)
Treg : T régulateurs
TSE : Tissue-Specific Element (Élément spécifique de tissu)
VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine
VIP : Vasoactive Intestinal Peptide (Peptide vasoactif intestinal)

CHAPITRE I – Introduction

I.1. Le neuropeptide VIP

En 1970, Said et Mutt isolèrent pour la première fois un peptide hautement vasoactif dans des extraits d'intestin de porc et le nommèrent *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP) [1]. Depuis, il a été identifié comme un neuropeptide largement diffusé dans l'organisme humain ; présentant un effet neuromodulateur dans de nombreux organes et tissus, comme le cœur, les poumons, les glandes thyroïdes, les reins, le cerveau, les voies urinaires ou encore les organes génitaux [2].

Le peptide VIP est un peptide synthétisé par les systèmes nerveux central et périphérique, et par les cellules de l'immunité telles que les lymphocytes [3] [4]. Il est constitué de 28 acides aminés et appartient à une grande famille de peptides incluant entre autre la sécrétine, le *Growth Hormone-Releasing Hormone* (GHRH), le *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP), le *Glucagon-Like Peptide* (GLP), le *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP), le glucagon, le *Peptide Histidine Methionine* (PHM), ou encore le *Peptide Histidine Isoleucine* (PHI) [5].

Le gène humain VIP cloné chez l'homme en 1985 [6] est localisé sur le bras long du chromosome 6 au niveau du locus 6q24-q27 [7], s'étendant sur 9 kb. Sa transcription est régulée par la voie de la *Cyclic AMP-dependent protein kinase* (PKA), qui agit par l'intermédiaire d'une séquence *cAMP Response Element* (CRE) située en amont du site d'initiation [8] [9] [10]. Ce site d'initiation CRE est aussi régulé par la voie de la *Protein Kinase C* (PKC). En effet, l'activation de la voie PKC par les esters de phorbol 12-O-tétra décanoylphorbol 13-acétate (TPA) et phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) permettent d'augmenter l'expression du gène VIP grâce à la séquence CRE [11] [12]. Ces esters de

phorbol peuvent aussi activer l'expression du gène VIP par l'intermédiaire d'un autre site d'initiation, la séquence *TPA/PMA-Responsive Element* (TRE) [13]. Des études montrent que le promoteur du gène VIP présente également des sites pouvant interagir avec des cytokines (*Cytokine Response Element*) (CyRE), des éléments spécifiques du tissu (*Tissue-Specific Element*) (TSE) et des facteurs de transcription activateurs de la séquence *Activator Protein 1* (AP-1) [14] [15].

La transcription du gène VIP permet d'obtenir un transcrit primaire codant pour un prépropeptide de 170 acides aminés possédant à la fois VIP et PHM/PHI, nommé le prépro-VIP [16] [17]. Un clivage du peptide signal par un signal peptidase du prépro-VIP génère ensuite un pro-VIP de 148 acides aminés au sein du réticulum endoplasmique. Puis le pro-VIP est clivé par des prohormones convertases en VIP-GRK (prépro-VIP₁₂₅₋₁₅₅) et PHM-GKR (prépro-VIP₈₁₋₁₁₀) [18]. VIP-GRK et PHM-GKR sont par la suite clivés par des enzymes carboxypeptidase-B-like en VIP-G et PHM-G [16]. Finalement les produits obtenus, VIP-G et PHM-G sont métabolisés par des enzymes *Peptidyl glycine α -Amidating Monoxygenase* (PAM) en VIP et PHM biologiquement active, avec un domaine C-terminal aminé.

1.1.1 Récepteurs du VIP

Le VIP interagit avec 3 types de récepteurs nommés IUPHAR (*International Union of Pharmacology*) : PAC1, VPAC1 et VPAC2 [19]. Ils font partie de la famille B (*Secretin like receptor family*), appelée aussi classe II des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires [20] [21]. Ces récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 lient le peptide VIP avec une affinité similaire (Kd : 3 à 10 nM).

I.1.1.1 Le récepteur VPAC1

Le récepteur VPAC1 a été initialement identifié dans le poumon de rat [22] puis a ensuite été cloné chez l'homme en 1993 [23]. Sa caractérisation a permis de montrer que ce récepteur est codé par un gène constitué de 13 exons et qu'il est composé de 457 acides aminés [24]. Le récepteur VPAC1 a par la suite été identifié dans le système nerveux central (SNC) plus précisément au sein du cortex piriforme, du cortex cérébral, du noyau amygdalien latéral, du noyau supraoptique, du plexus choroïde ou encore de la glande pinéale [25] [26] [27]. Toutefois VPAC1 a également été observé dans les tissus périphériques comme dans le foie, les reins, la prostate, la rate, les poumons, le tractus gastro-intestinal, les ganglions lymphatiques, et presque dans tous les tissus épithéliaux humains [28].

Au sein du système immunitaire, Guerrero et ses collaborateurs ont décrit la présence du récepteur VPAC1 dans les Lymphocytes du sang périphérique (LSP) [29]. Plus tard, il a été observé que ce récepteur est également présent dans les monocytes, neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques (CDs), cellules NKs et les lymphocytes B et T [30] [31] [32] [33] [34] [35] (Tableau 1).

I.1.1.2 Le récepteur VPAC2

Le récepteur VPAC2 a été identifié dans l'hypophyse de rat [36], puis chez l'homme en 1994 [37]. Ce récepteur est composé de 437 acides aminés et est également codé par un gène constitué de 13 exons [38]. Il présente 49 % d'homologie avec le récepteur VPAC1 et a été retrouvé dans le SNC tel que dans le cortex cérébral, les noyaux périventriculaires, le thalamus, l'hypothalamus et dans les amygdales [39] [26] [27]. Ce récepteur est aussi exprimé dans les cellules acineuses pancréatiques, les cellules folliculaires thyroïdiennes, la glande surrénale, la rétine, les alvéoles pulmonaires, et dans les vaisseaux sanguins [40].

Cependant il a été rapporté que VPAC2 est également exprimé d'une façon inductible dans les lymphocytes et les macrophages (Tableau 1). En effet, ce récepteur est détecté dans les lymphocytes seulement après une stimulation des molécules CD3 associées au *T Cell Receptor* (TCR) et dans les macrophages après une stimulation avec du lipopolysaccharide (LPS) [33].

I.1.1.3 Le récepteur PAC1

Le récepteur PAC1 a été le premier récepteur au VIP à être cloné et présente une expression considérable dans le cerveau [41] et une expression plus faible dans la gorge et le foie [42]. Plus tard, il a été caractérisé dans les cellules de l'immunité, mais seulement dans les macrophages [43] (Tableau 1).

Types cellulaires	Espèces	VPAC ₁	VPAC ₂	PAC ₁
HMC-1 (mastocytes)	Humain	+	+	ND
Mastocytes de la peau	Humain	ND	+	ND
HC3 (mastocytes)	Souris	-	+	-
Monocytes	Humain	+	-	ND
Monocytes	Humain	ND	+	ND
THP-1 (monocytes)	Humain	+	-(+)	+
Raw 264.7 (macrophage)	Souris	+	-(+)	+
Macrophages Péritonéaux	Rat	+	ND	ND
Macrophages Péritonaux	Rat	+	ND	+
Ostéoclastes	Souris	+	-	+
Moelle osseuse	Souris	+	+	+
Ostéoblastes	Souris	-(+)	+	-
Ostéoblastes	Humain	+	-	-
Macrophages alvéolaires	Souris	+	+	ND
Macrophages alvéolaires	Humain	ND	+	ND
Cellules de granulome	Souris	+	+	ND
cellules T CD4 + Spléniques	Souris	ND	-(+)	ND
Lymphocytes	Rat	+	ND	ND
Thymocytes	Rat	+	ND	ND
Lymphocytes	Souris	+	-	ND
Thymocytes/splénocytes	Souris	+	ND	ND
Thymocytes/splénocytes	Souris	+	-(+)	ND
Thymocytes/splénocytes	Souris	+	+	ND
Thymocytes	Humain	+	+	ND
Intestinal T lymphocytes	Souris	+	+	ND
Lymphocytes périphériques	Humain	+	+	ND
Cellules de Langerhans	Souris	+	+	-
Microglie	Rat	+	-	+
Microglie	Souris	+	-	+
Kératinocytes	Humain	+	+	-
Kératinocytes	Humain	+	-	ND

Tableau 1 : Présence des récepteurs VPAC₁, VPAC₂ et PAC₁ dans les cellules du système immunitaire et les cellules apparentées [44]. Ces trois types de récepteurs ont été depuis retrouvés exprimés dans d'autres cellules de l'immunité comme les CD₄ humaines et les neutrophiles [45]. (ND : Non déterminé), + : Présence du récepteur, - : Absence de récepteur).

I.1.1.4 Les récepteurs VPAC1, VPAC2, PAC1 et les voies de signalisation

Suivant les tissus, ces 3 récepteurs interagissent différemment avec les protéines G activant alors différentes voies de signalisation dont la plus commune est celle faisant intervenir l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) comme second messager (figure 1). Ainsi la liaison du VIP sur les récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 conduit à l'activation des protéines G α s qui vont alors interagir avec un effecteur tel que l'adénylyl cyclase (AC) menant à la production d'AMPc. Ces récepteurs sont aussi impliqués dans d'autres voies de signalisation comme l'accumulation de calcium intracellulaire [Ca $^{2+}$]_i, la régulation de l'activité de la phospholipase D (PLD), des tyrosines kinases, des canaux calciques, des GTPases Rho, et de Src. Ils peuvent aussi activer la phospholipase C (PLC) et ainsi augmenter la concentration de [Ca $^{2+}$]_i par l'intermédiaire du couplage avec les protéines G α_q et G α_i (G α_i seulement avec VPAC1 et VPAC2). L'activité de la PLD peut être stimulée par les trois types de récepteur par l'intermédiaire d'ADP-Ribosylation Factor (ARF) (pour VPAC1 et VPAC2) et PKC (pour PAC1) [46].

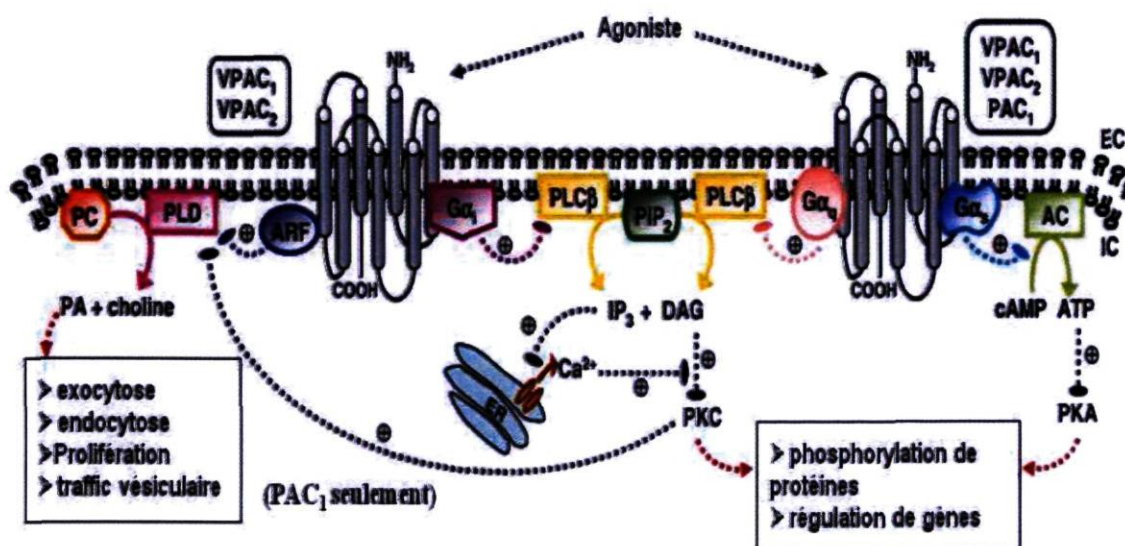


Figure 1 : Voies de signalisations des récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 [46].

Dans la plupart des cellules cibles, les récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 sont couplés positivement à l'AC par l'intermédiaire de la protéine G α s, et peuvent ainsi stimuler la production d'AMPc et la voie PKA (Protéine Kinase A) [47]. L'activation de la PKA mène à la phosphorylation du facteur de transcription *cAMP Response Element Binding* (CREB). Ce dernier se fixe alors sur les éléments de réponse à l'AMPc, et régule la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, la prolifération et la migration dans différents tissus et cellules [48] [49].

La voie de la PLC est activée grâce au couplage des récepteurs avec la protéine G α q. La PLC hydrolyse le phosphatidylinositol diphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3), ce qui conduit à l'augmentation de [Ca²⁺]_i [50]. Les effets du VIP sur la prolifération ou la différenciation cellulaire sont généralement liés à l'activation en cascade, par l'intermédiaire des kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) ou du calcium (PKC), et des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) [51].

I.1.2 Les fonctions du VIP

I.1.2.1 Généralités

Le VIP participe à la régulation de diverses fonctions physiologiques chez de nombreuses espèces dont l'Homme. En effet, sa libération par les terminaisons nerveuses lui vaut une action sur la relaxation de la musculature lisse vasculaire et non vasculaire [52] [53], la sécrétion endocrine et exocrine [54] [55], le métabolisme (glycogénolyse et lipolyse) [56] [57] ou encore dans l'inflammation [44].

Toutefois, une dérégulation de la quantité de VIP peut être associée à plusieurs pathologies comme lors d'un infarctus du myocarde où une augmentation de la libération de VIP a été observée dans le cœur [2]. De plus, une hypersécrétion de VIP a été observée dans la dermatite atopique [58], l'épilepsie [59], le cancer du pancréas [60] ou les tumeurs neurogéniques [61]. En revanche, une déficience en VIP a été décrite dans la maladie de Hirschsprung [62], l'asthme sévère [63], le diabète insulino-dépendant [64], la mucoviscidose ou la maladie d'Alzheimer [65].

Au sein de l'immunité, le neuropeptide VIP joue un rôle essentiel en agissant comme un facteur anti-inflammatoire en affectant les réponses de l'immunité innée [69] [80] [44] [81] et adaptative [82] [83] [96] [97] [73]. L'immunité innée implique les cellules NKs (*Natural Killers*), les macrophages, et les neutrophiles. La réponse innée est rapide et non spécifique. Principalement basée sur la reconnaissance de *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) qui peuvent être des composants des parois bactériennes, de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien ou de l'Acide ribonucléique (ARN) viral, elle est capable d'informer rapidement l'organisme de la présence d'un agent infectieux. C'est principalement le rôle des CD qui participent à la fois à la réponse innée et adaptative. La réponse adaptative se produit plus tard, à la suite de l'activation des lymphocytes T et B grâce à des récepteurs spécifiques. Contrairement à la réponse innée, l'immunité adaptative favorise l'élaboration de la mémoire pour un antigène spécifique.

I.1.2.2 Fonctions du VIP sur les différents types cellulaires

Les neutrophiles

Les neutrophiles font partie du système immunitaire non spécifique. Leur rôle principal est de phagocyter et de détruire les différents agents pathogènes. Étant les premières cellules à arriver au site inflammatoire, elles assurent la phase initiale de la défense permettant ainsi le développement subséquent de la réponse immunologique qui est spécifique et dirigée contre le pathogène.

L'équipe de Palermo et ses collaborateurs ont montré que le VIP diminue l'expression des récepteurs reconnaissant la portion Fc des IgG (Fc gamma R) et diminue l'activation des neutrophiles par les IFN γ [67]. Il est montré également que le VIP présente un effet sur les neutrophiles en inhibant la migration de ces cellules lorsqu'elles sont stimulées par le *N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* (fMLP) [68]. De plus des expériences in vivo chez le rat montrent qu'une administration locale ou systémique d'un analogue synthétique du VIP inhibe le recrutement des neutrophiles stimulés par l'IL1 β dans les voies respiratoires [69].

Les cellules NKs

Les cellules NKs constituent 10 à 15 % des lymphocytes sanguins. Elles sont généralement considérées comme des composants du système immunitaire inné. Les cellules NKs sont décrites comme des lymphocytes T cytolytiques, pouvant provoquer directement la mort des cellules tumorales et des cellules infectées par un virus en absence d'immunisation spécifique. Ces cellules produisent également de l'IFN γ , du *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) ainsi que des facteurs de croissance comme le *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF), le *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF), ou

encore des chemokines incluant le *Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (CCL2)* , *Chemokine (C-C motif) Ligand 3 (CCL3)* , *Chemokine (C-C motif) Ligand 4 (CCL4)*, *Chemokine (C-C motif) Ligand 5 (CCL5)* , et le *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1 (CXCL1)* [96].

Plusieurs expériences mettent en évidence un effet modulateur du peptide VIP sur les fonctions des cellules NKs. Par exemple des lymphocytes préincubés avec le VIP favorise une augmentation de l'activité des cellules NKs [97] et que l'inhibition de la cytotoxicité des NKs et la production d'IFN γ provoquée en présence de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine (GP120) est restaurée par le VIP [98].

Les macrophages

Les macrophages et les neutrophiles constituent la première ligne de défense de l'organisme. Les macrophages sont à l'interface entre l'immunité innée et acquise. En effet, leur première fonction est la protection face aux infections notamment grâce à la phagocytose. Également les produits microbiens comme le LPS activent les macrophages à sécréter des produits proinflammatoires tels que le TNF α , l'IL12, l'IL1, l'IL6 et le *Nitric Oxide* (NO). Par rapport aux effets observés du VIP sur ces macrophages, on observe qu'il inhibe la production des médiateurs TNF α , IL-12, IL-6 et NO, in vivo et in vitro, et stimule la production de cytokines antiinflammatoires comme l'IL-10 [80] [44] [81]. Le VIP inhibe aussi la production des chimiokines CXCL2 (MIP2), CXCL1 (lymphotactin), CCL3 (MIP1 α), CCL4 (MIP1 β), CCL2 (MCP1) et CCL5 (RANTES) intervenant dans le recrutement de cellules de l'immunité.

En plus de participer à la réponse du système immunitaire innée, les macrophages servent de lien comme les CD dans l'immunité adaptative en présentant l'antigène et en stimulant spécifiquement les lymphocytes T. Une des actions de VIP sur ces cellules sera de réduire l'activité de stimulation et costimulation des macrophages. En effet, l'une des actions du

VIP est favorise d'une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) au sein de macrophages activés avec du LPS [82]. L'effet inhibiteur du VIP sur l'expression de B7.1 et B7.2 corrélé avec une réduction de la stimulation de la prolifération des lymphocytes T par les macrophages [82] [83]. D'autres études montrent que le VIP diminue la production de cytokines proinflammatoires comme le TNF α , l'IL6, et l'IL12 et augmente la production de l'IL10 par des macrophages à la suite d'une stimulation avec un antigène [84]. Enfin le VIP inhibe l'activité phagocytaire, la production de radicaux libres, l'adhérence et la migration des macrophages [85] [86] [87] [88].

Les lymphocytes T

La réponse immune adaptative dirigée contre un antigène spécifique est initiée par le contact entre une cellule présentatrice d'antigène et des lymphocytes T naïves. Suivant une stimulation antigénique, les LT-CD4⁺ se polarisent en cellules effectrices de type *T helper* (Th1 ou Th2). Les cellules Th1 secrètent des cytokines comme l'IL2, INF γ et le TNF β et génèrent une réponse cellulaire. Les cellules Th2 secrètent des cytokines comme l'IL4, IL5 et l'IL10 nécessaire pour activer une réponse de type humorale avec la synthèse d'IgG1 et IgE. La polarisation des LT-CD4⁺ en Th1 ou Th2 se fera selon la nature de la cellule présentatrice d'antigène, et la nature et la quantité de l'antigène [89].

Des agents intervenant dans l'activation du système immunitaire telle que le LPS, le TNF α , l'IL6 et l'IL1 β , ou dans l'apoptose comme la dexaméthasone provoquent la production et la libération de VIP par les lymphocytes dans les tissus lymphoïdes [90]. Le VIP est aussi libéré par les lymphocytes Th2 [91]. Des résultats obtenus *in vivo*, montrent qu'une administration de VIP active une réponse de type Th2 aux dépens de la réponse de type Th1 chez des souris immunisées contre un antigène *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH) [83]. Subséquemment, des souris déficientes en VPAC2 ont une réponse augmentée en

cellules T de type Th1 et des souris surexprimant VPAC2 présentent des réponses cellulaires typiques de type Th2 [76] [77].

Toutefois plusieurs travaux ont montré que le VIP favorise aussi la génération des cellules T régulatrices (Treg) en présence d'un antigène spécifique au récepteur TCR *in vivo* [92]. Le VIP provoque l'activation des cellules Treg en favorisant une augmentation de l'expression des molécules CD62, CD69, FoxP3, CTLA4 ainsi que la production de l'IL10 et de TGF β 1, deux molécules suppressives [93] [94] [95].

Il est observé que ce peptide affecte également la migration des LT-CD4+. Une administration de VIP *in vivo* permet d'inhiber la migration des LT-CD4+ vers les nœuds lymphoïdes et les plaques de Peyer [96] [97].

Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) appuient l'immunité humorale adaptative spécifique. Après l'activation par un antigène, les LB prolifèrent et se différencient en plasmocytes ou en LB mémoires. Elles sécrètent par la suite des anticorps ou immunoglobulines (Ig) qui neutralisent le pathogène [98].

Par contre l'expression des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 est faiblement observée au sein de ces LB. Toutefois l'effet du VIP peut se faire d'une façon indirecte. Une étude montre que ce peptide peut supprimer la différenciation des LB par l'intermédiaire des macrophages [35]. Il permet également d'augmenter la production d'IgA par les LB en présence de CDs dérivées des plaques de Peyer, jouant ainsi un rôle important dans la limitation de la pénétration des bactéries commensales à travers la muqueuse intestinale [99].

Les cellules dendritiques (CDs)

Les CDs participent à la fois à la réponse innée et acquise. Il existe deux grands types de CDs : les CDs plasmacytoïdes d'origine lymphoïde et les CDs myéloïdes. Les CDs plasmacytoïdes sont retrouvées dans les organes lymphoïdes, le thymus et dans le sang. Les CDs d'origine myéloïde (CDs interstitielles et cellules de Langerhans) se retrouvent dans les muqueuses et la peau respectivement [71]. Elles existent sous deux états phénotypique et fonctionnel distincts. En présence de pathogènes, elles capturent le pathogène par endocytose ou phagocytose et subissent une maturation avec une augmentation de l'expression de molécules intervenant dans la stimulation comme CD83, CD40, CD86 et le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II). Les CDs, sous l'action de la *Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)* migrent, vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T et B [72].

Le VIP a des effets différents selon que la CD soit mature ou immature. En effet, lorsque les CDs sont immatures, le VIP stimule l'expression de CD86 et augmente la capacité de ces cellules à activer les lymphocytes T [73]. Au contraire, lorsque les CDs sont matures, le VIP inhibe cette fois-ci l'expression des molécules coactivatrices CD80/CD86, ce qui réduit fortement leur capacité à activer les lymphocytes T lors de la présentation antigénique [73]. Ces travaux indiquent que le VIP affecte différemment les CDs matures et immatures. À la suite d'une activation des CDs par le LPS, le VIP agit comme un agent anti-inflammatoire alors que lors de l'absence d'activation de ces cellules le VIP contribue à la polarisation des LT-CD4⁺ en cellules Th2 effectrices [73]. Il a été aussi observé que ce neuropeptide peut affecter directement la maturation et la migration des CDs vers les organes lymphoïdes secondaires afin de prévenir une réponse immunitaire. Effectivement, le VIP pourrait activer la maturation des CDs en synergie avec le TNF- α [74] et stimuler ou inhiber la migration de ces CDs matures d'une façon dose-dépendante en réponse à des chemokines CCL5 et CCL19 observées grâce à des essais de chimiotaxie *in vitro* [75].

Il est également montré que le VIP affecte la polarisation des LT-CD4⁺ en cellules Th1 et Th17 au profit des cellules Th2 et Treg. Des études *in vivo* indiquent que la surexpression des récepteurs VPAC2 dans des souris transgéniques favorise les réponses cellulaires de type Th2 mais que des souris *knock-out* (KO) pour VPAC2 présentent une prévalence pour la réponse de type Th1 [76] [77]. Des effets *in vitro* sont de même observés avec une production de cytokines de type Th2 (IL4, IL10 et IL5) par des lymphocytes activés avec des CD^s immatures traitées au VIP. Lorsque les CD^s sont stimulées avec du LPS, une production en cytokines Th1 (IL2 et IFN γ) est identifiée. Par contre, en présence de VIP, il y a une réduction de la quantité de ces cytokines de type Th1 [73].

D'autres études montrent que des CD^s différenciées à partir de moelle osseuse de souris en présence de VIP deviennent des CD^s tolérogéniques produisant des niveaux significatifs en IL10 et favorisant la génération de cellules Treg [78] [79].

Le neuropeptide VIP participe activement à la régulation des réponses du système immunitaire. Il semble être un élément régulateur de l'homéostasie de cette réponse, qui en principe doit faire la distinction entre un PAMP et un DAMP. Certaines études ont montré que le VIP régule les effets provoqués par le LPS (un PAMP). Par contre aucune étude n'a été réalisée sur l'impact du VIP sur les réponses aux cristaux d'urate monosodiques qui sont également considérés comme des DAMPs

1.2. Signaux de dangers endogènes et UMS

1.2.1 Définitions des signaux de dangers

Les cellules de l'immunité utilisent une gamme de récepteurs nommée *Pattern Recognition Receptor* (PRRs) qui permettent la reconnaissance des pathogènes. L'activation de ces récepteurs active la réponse immunitaire innée. Ils reconnaissent des motifs structuraux très conservés présents sur l'enveloppe des micro-organismes, les PAMPS. Ces motifs sont absents des cellules eucaryotes. Les PAMPS peuvent être des capsides virales, des constituants bactériens comme le LPS (élément constitutif de la paroi des bactéries à gram négatif), ou encore des *unmethylated Cytosine-Guanine nucleotide repeats* (CpG) qui sont des répétitions de nucléotides non méthylés abondamment retrouvées dans l'ADN des bactéries et des virus.

Cependant, l'immunité innée peut également être déclenchée par des molécules endogènes nommés DAMPS ou encore des signaux de dangers. Les DAMPS sont des molécules libérés par des cellules qui ont subi un stress ou un dommage [103]. Ce sont des molécules qui peuvent activer la réponse immunitaire tout comme les PAMPS (figure 2) [104].

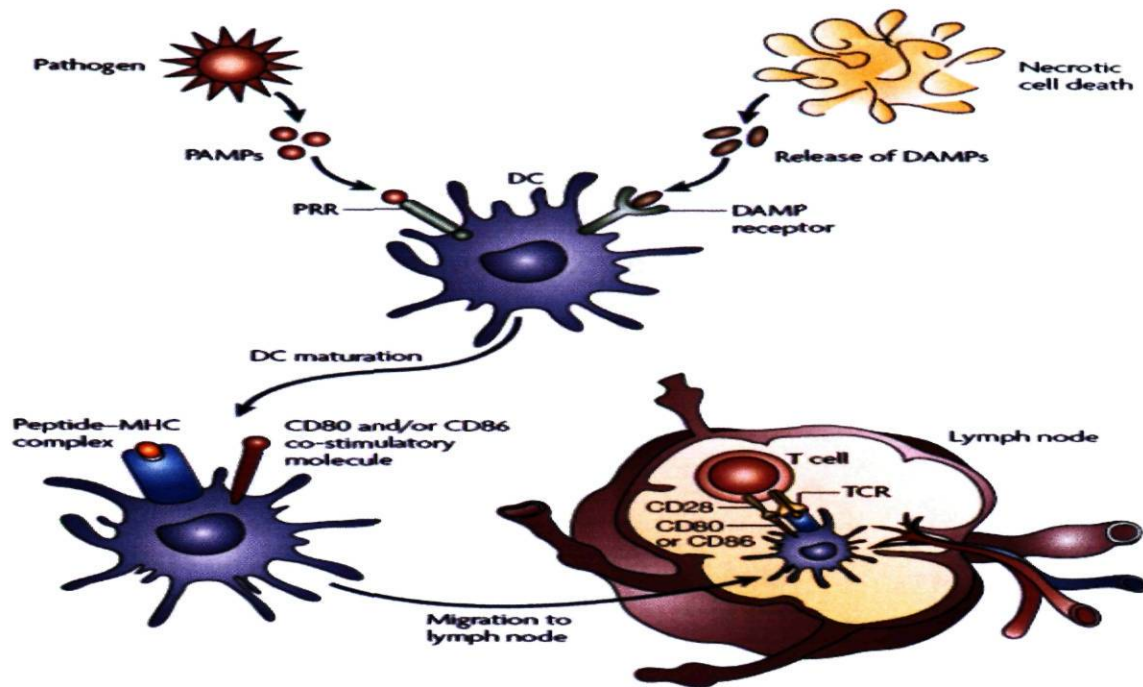


Figure 2 : Modèle d'activation du système immunitaire par les PAMPS et DAMPS. Les CDs sont présentes dans tous les tissus où elles sont dans un état immature. Sous cette forme, elles permettent de guetter la présence éventuelle d'un pathogène. Ces cellules reconnaissent les PAMPS par l'intermédiaire des PRRs mais elles peuvent également reconnaître les signaux de danger DAMPS provenant d'un endommagement cellulaire. Après liaison de PAMPS ou de DAMPS, les CDs sont activées et migrent vers les tissus lymphoïdes où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T [105].

Les DAMPS libérés par les cellules endommagées peuvent être : *High Mobility Group Box protein-1* (HMGB1), S100A8/S100A9, des protéines de choc thermique, de l'ADN, de l'*Adénosine triphosphate* (ATP) et de l'acide urique (figure 3) [106] [107] [108]. Comme pour les PAMPS, les DAMPS ont été proposés pour stimuler également les CDs locales. Il a été montré que les cellules nécrotiques pouvaient stimuler les CDs et déclencher la migration de ces cellules vers les nœuds lymphatiques *in vivo* (figure 2) [109] [110]. Les DAMPS permettent de stimuler le système immunitaire afin de renouveler les tissus et d'éliminer les débris cellulaires tandis que les PAMPS permettent l'élimination des pathogènes [111] [112].

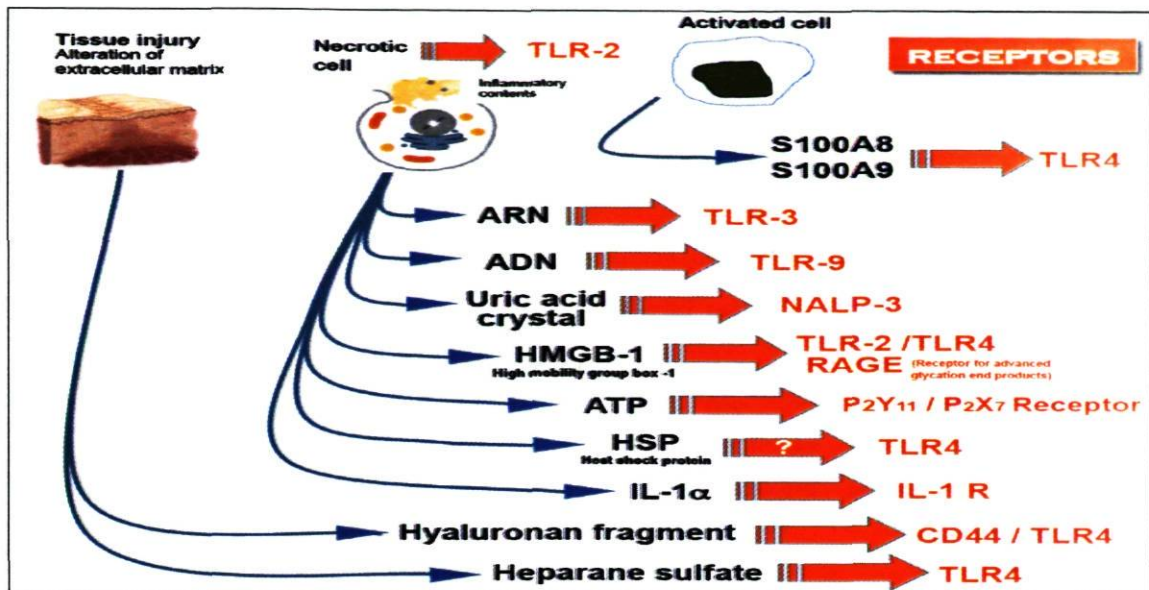


Figure 3 : Molécules de signaux de dangers endogènes DAMPS, libérées à la suite d'un endommagement tissulaire et une nécrose des cellules (Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur, Paris).

Les signaux de danger endogènes peuvent provenir de cellules immunitaires activées, de cellules nécrotiques et d'une altération de la matrice extracellulaire. Elles interagissent avec les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Les DAMPS interviennent dans les processus permettant de conserver l'intégrité des tissus.

1.2.2 Les cristaux d'UMS

Les DAMPS qui retiennent notre attention sont les cristaux d'UMS. Les cristaux d'UMS ont été identifiés comme étant des signaux de dangers endogènes en 2003 par l'équipe de Yan Shi et ses collaborateurs. Ils ont observé que les cristaux d'UMS formés à partir d'acide urique étaient le principal signal de danger endogène libéré par des cellules endommagées [108].

L'acide urique est le produit final de la dégradation des purines. Il est normalement retrouvé dans les tissus à l'état physiologique. Lors d'une lésion cellulaire, une dégradation rapide des acides nucléiques libérant en grande quantité des purines qui seront par la suite transformées en acide urique est observée. Une fois retrouvé dans le milieu extracellulaire, cet acide urique lie le sodium pour former de l'acide urique monosodique qui précipite en présence d'anticorps tels que les IgM [113]. Or la forme cristallisée de l'acide urique est connue pour avoir des propriétés inflammatoires [108] [114].

Les études *in vitro* montrent que les cristaux d'UMS augmentent l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 au sein de CD₄ primaires dérivées de moelle osseuse de souris [107]. Ces cristaux stimulent également un complexe de senseur de signaux de danger nommé *N*Acht *L*eucine-*r*ich *r*epeat *P*rotein 3 (NALP3) inflammasome dans ces cellules puis l'activation de la caspase 1 qui aboutit à la production d'interleukines pro-inflammatoires IL1 β et IL18 (figure 4) [113]. Or ces cytokines jouent un rôle important dans l'activation du système immunitaire. En effet, l'IL1 β participe au recrutement des cellules inflammatoires car une administration de ce peptide dans les poumons chez différents espèces provoque un influx de neutrophiles [114] [115]. Également, il est montré que ce peptide est impliqué dans la prolifération cellulaire [116], la différenciation [117] et l'apoptose des cellules inflammatoires [118].

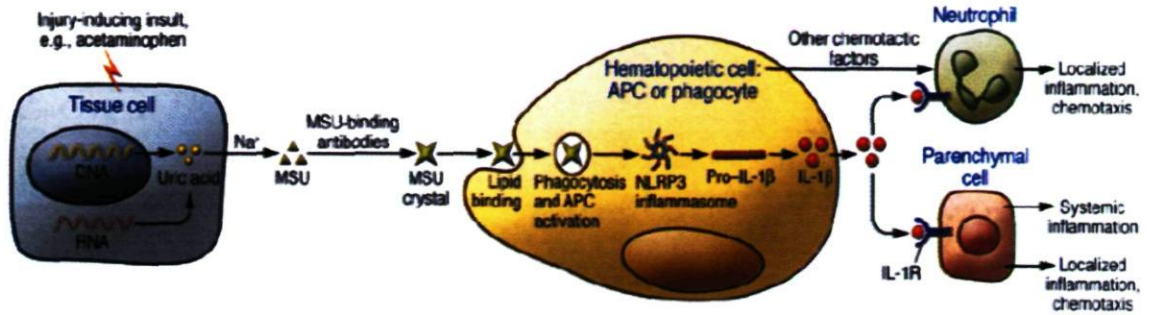


Figure 4 : Mécanismes d’activations du système immunitaire par les cristaux d’UMS. Les tissus endommagés libèrent de l’acide urique à partir de purines. Cet acide urique lie le sodium dans le milieu extracellulaire et forme de l’acide urique monosodique. Plusieurs facteurs sériques comme les anticorps lient par la suite l’acide urique monosodique pour former des cristaux d’UMS. Ensuite, ces cristaux interagissent avec la membrane des cellules cibles comme les cellules présentatrices d’antigènes. Il y aura alors activation de ces cellules et libération de cytokines proinflammatoire comme l’IL1 β [114].

Les cristaux d’UMS ont été identifiés comme des signaux de danger endogènes pouvant déclencher la maturation des CD [108]. Or ces études ont été réalisées sur des CD dérivées de moelle osseuse de souris. Notre laboratoire vient de confirmer que ces cristaux pouvaient également provoquer une maturation des CD humaines primaires (figure 5). En effet, nous pouvons observer après une stimulation des CD pendant 48 h que les cristaux d’UMS provoquent une augmentation de l’expression des marqueurs de stimulation HLA-DR et de costimulation CD86. Nous observons également que ces cristaux provoquent une diminution de l’expression du récepteur DC-SIGN qui est un récepteur connu pour être impliqué dans la phagocytose [117]. Ces résultats préliminaires montrent que les DAMPS tels que les cristaux d’UMS peuvent provoquer la maturation des CD tout comme le LPS. Cependant cette maturation semble moins intense lorsque les CD sont activées par des cristaux d’UMS que par le LPS (figure 5).

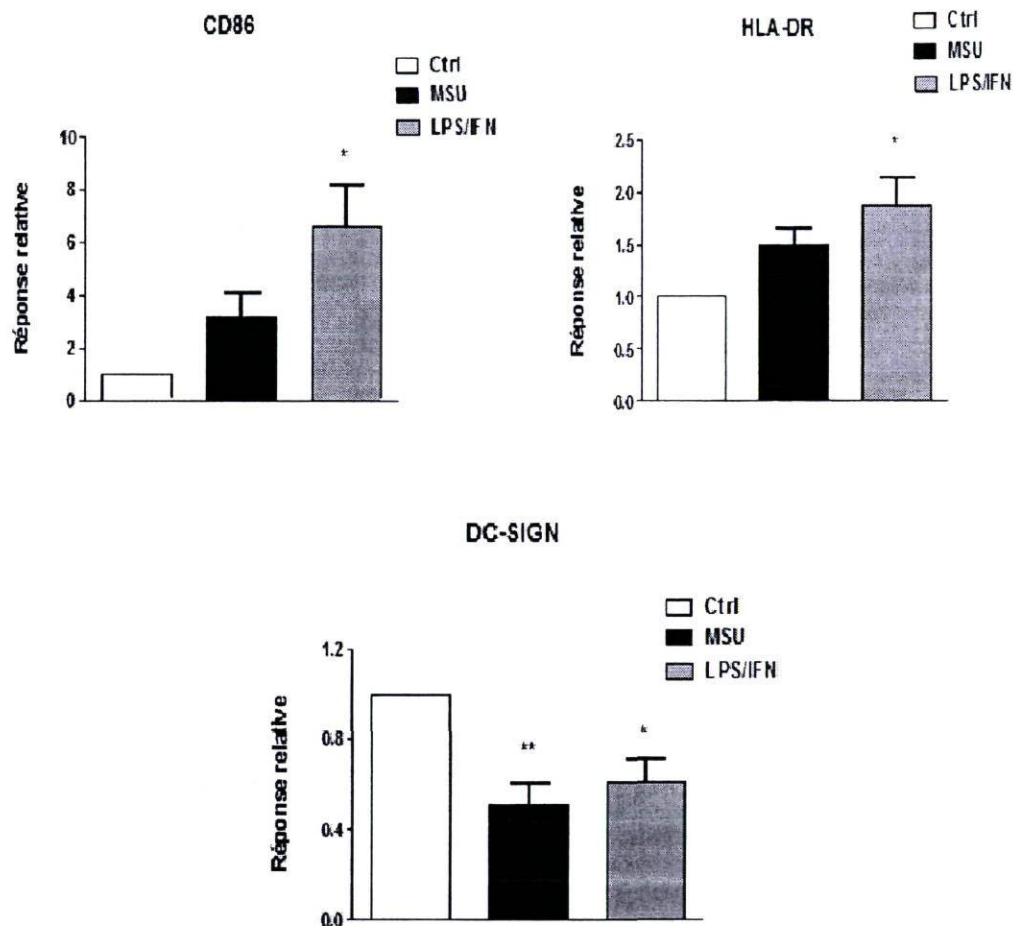


Figure 5 : Impact des cristaux d'UMS et du LPS sur la maturation des CD8 (Communication personnelle avec Sébastien Simard et Caroline Gilbert). Les CD8 immatures (500 000 CD8 / 500 μ l) ont été incubées avec du milieu seul ou en présence de cristaux d'UMS (0.15 mg/ml final) ou de LPS (1 μ g/ml final) et d'INF γ (1000 U/ml final) pendant 48 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des molécules CD86, HLA-DR et DC-SIGN sont analysées par cytométrie de flux.

Les CD8 sont connues pour jouer un rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Afin d'initier la réponse adaptative, les CD8 présentent les antigènes par l'intermédiaire des molécules types de CMHI et II. Ces molécules peuvent être présentes à la surface des CD8 ou sur des vésicules libérées par les CD8. Ces vésicules, appelées exosomes peuvent aussi effectuer la présentation antigénique et aider la CD [118].

I.3. Les exosomes

I.3.1 Caractérisation des exosomes

Les exosomes sont des vésicules bioactives d'une taille de 30 à 100 nm d'origine endosomale [119]. Ils ont été décrits à l'origine comme de petites vésicules secrétées par des réticulocytes pendant leur maturation en érythrocytes permettant l'élimination du récepteur de la transferrine [120]. Par la suite, il a été mis en évidence que les exosomes sont libérés par plusieurs types cellulaires tels que, les cellules épithéliales [121], les LB et LT [122] [123], CD8 [118] et dans d'autres types cellulaires. Ils peuvent aussi être retrouvés dans les liquides biologiques comme le plasma, le sang et l'urine [124]. La formation de ces exosomes se fait à partir de l'invagination de la membrane des endosomes multivésiculaires tardifs (MVBs : *MultiVesicular Bodies*). Les MVBs fusionnent ensuite avec la membrane plasmique puis les exosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire (figure 6).

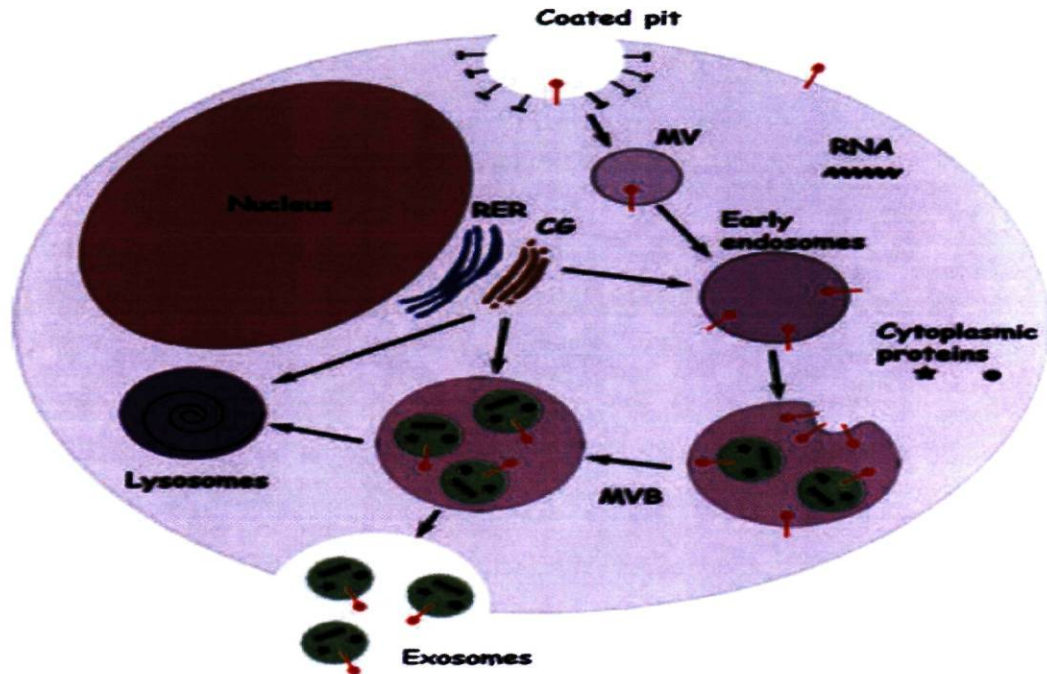


Figure 6 : Biogenèse des exosomes [125]. CG : *Complex Golgi* ; RER : *Rough Rendoplasmic Reticulum* ; MV: *MicroVesicle* ; MVB : *MultiVesicular Body*.

Les exosomes peuvent être isolés du milieu extracellulaire et quantifiés. La quantification de ces microvésicules peut se faire avec des anticorps dirigés contre les molécules MHC-II (HLA-DR), MHC-I, CD86, ICAM-1, CD63 et CD82. En effet, les exosomes purifiés à partir de surnageant de CDs sont enrichis en ces molécules et contiennent également d'autres protéines membranaires, ainsi que des protéines cytoplasmiques et des ARN [126]. En ce qui a trait aux protéines, des familles de protéines communes ont été observés comme les molécules du cytosquelette, ou les molécules impliquées dans le transport et la fusion [127] [128] (figure 7). Par contre, elles peuvent aussi contenir des protéines qui sont en étroite relation avec l'état d'activation de la cellule. Par exemple il a été observé que les molécules CMH-II, CD40 et CD86 sont présentes en plus grande quantité dans les exosomes lorsque les CDs sont matures [122] [126] [129].

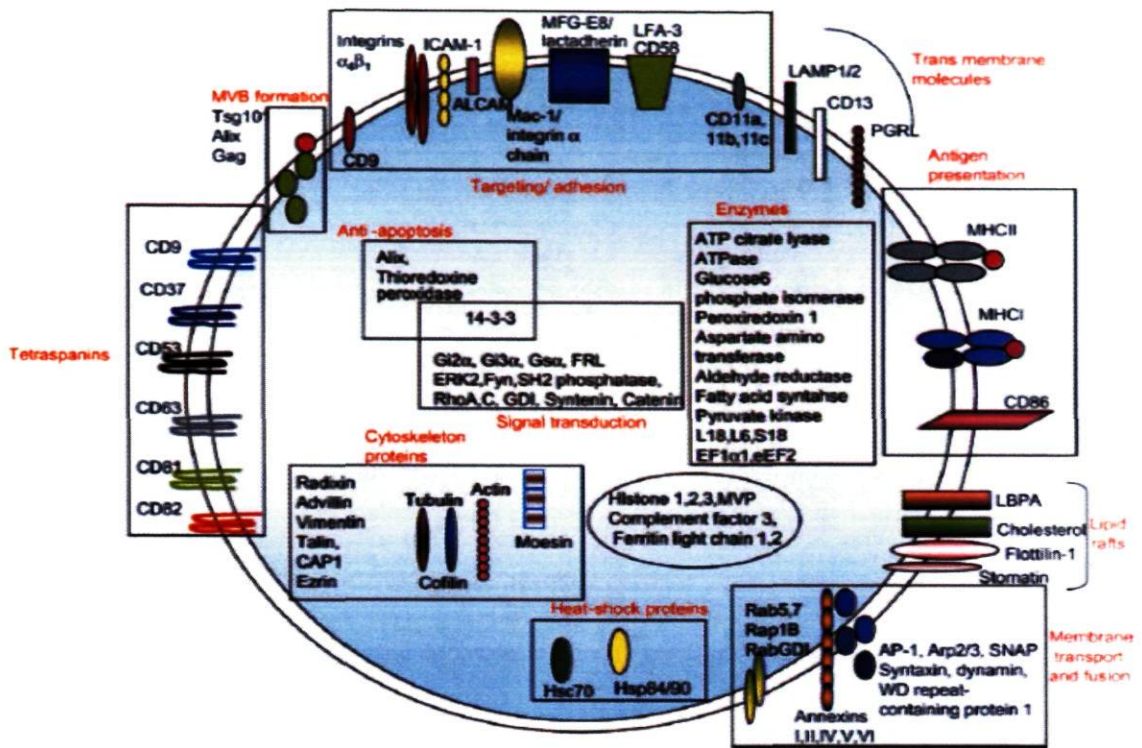


Figure 7 : Compositions des exosomes [130].

I.3.2 Fonctions des exosomes

Les exosomes favorisent la communication intercellulaire [131] [132] se qui leurs confère ainsi plusieurs rôles par exemples des rôles dans l'élimination de protéines obsolètes [120], dans l'évasion tumorale [133], mais également dans l'immunité [118] [129] [134] [135] [136].

I.3.2.1 Rôles des exosomes dans l'immunité

Les exosomes participent à la régulation de plusieurs fonctions du système immunitaire en présentant des antigènes du soi ou du non-soi et en exprimant à leur surface différentes molécules inhibitrices ou activatrices des cellules du système immunitaire [134] [135]. Ces microvésicules physiologiques jouent plusieurs rôles tels que la régulation de la réponse immunitaire, l'induction de la tolérance [136] et la présentation antigénique [129]. Pour les aider dans leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes, les CD₄⁺ relâchent de manière constitutive de grandes quantités d'exosomes dans le milieu extracellulaire [118]. En effet, les exosomes libérés par des CD₄⁺ peuvent stimuler les lymphocytes T CD₄⁺ *in vitro* et *in vivo* [137]. Ces exosomes permettent aussi à ces CD₄⁺ de transférer des complexes majeurs d'histocompatibilité vers d'autres CD₄⁺. Or ces complexes sont impliqués dans la présentation de peptides antigéniques. Un tel transfert permettrait donc une amplification de la réponse immunitaire grâce à une augmentation du nombre de CD₄⁺ possédants CMH-II présentant les peptides antigéniques [137]. Enfin, des exosomes produits par des LB et des mastocytes pourraient également participer à l'amplification de la réponse immunitaire grâce en outre à la présence de CMH-II [122] [138].

Outre la capacité des exosomes à stimuler les réponses du système immunitaire, plusieurs suggèrent que les exosomes peuvent également supprimer certaines réponses immunitaires [141].

1.3.2.2 Rôles des exosomes dans l'apoptose

Il a été montré que des cellules cancéreuses pouvaient produire des exosomes contenant une molécule proapoptotique FasL (Fas Ligand) et que ces exosomes avaient la capacité d'induire l'apoptose des cellules T [139]. L'apoptose des cellules T provoquée par ces exosomes dépendrait de la voie Fas-FasL [140]. L'équipe de Kim et ses collaborateurs ont observé que des CD8 transduites avec un vecteur adénoviral exprimant FasL produisent des exosomes pouvant supprimer l'inflammation dans le modèle murin provoqué par des mécanismes d'hypersensibilité de type retardé (DTH) [141]. Également, il a été observé que les exosomes provenant de patients atteints d'un carcinome épidermoïde oral présentaient une grande quantité de FasL corrélé en plus avec l'apoptose des cellules T chez ces patients [142]. D'autres études ont montré que les exosomes produits par des cellules T au cours de l'*Activation-Induced Cell Death* (AICD) qui est une forme d'apoptose induite, possédaient FasL mais aussi une autre molécule proapoptotique nommée APO2L (*APO2 Ligand*) ou connue sous le nom de *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL) [143] [144].

Ces exosomes et ces molécules proapoptiques pourraient avoir aussi un rôle important lors d'une infection par le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) qui est une maladie étudiée dans notre laboratoire. Des résultats préliminaires de notre laboratoire montrent que des CD8 infectées avec le VIH-1 augmentent la production d'exosomes et que ces exosomes présentent un contenu protéique enrichi en protéines jouant un rôle dans l'apoptose comme *Death Associated Protein3* (DAP3), *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1* (Apaf-1) et *Leukocyte-Specific Phosphoprotein of 76 kDa* (Slp76kDa).

De plus nous avons montré au sein du laboratoire que la maturation des CD en réponse aux cristaux d'UMS était accompagnée d'une augmentation de la quantité en exosomes extracellulaires produits par les CD (figure 8) et que ces exosomes contenaient aussi DAP3 (figure 9).

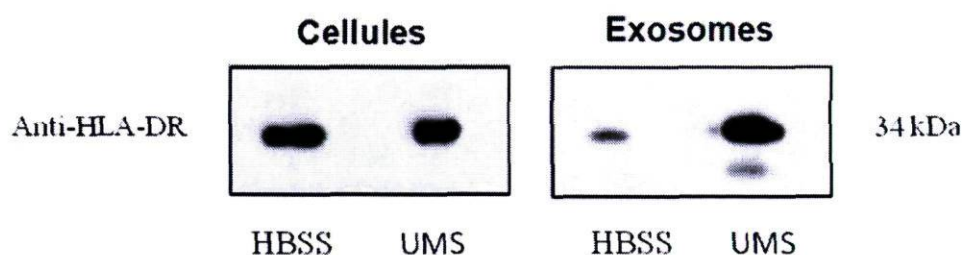


Figure 8 : Augmentation de la quantité d'exosomes produits par des CD à la suite d'une stimulation par des cristaux d'UMS pendant 48h (Communication personnelle avec Aliona Bancila et Caroline Gilbert). Les CD (5×10^5 cellules/ml) ont été stimulées avec 0,3 mg/ml de cristaux d'UMS et incubées 48h à 37 °C, les surnageants récoltés et filtrés sur membrane de 0.22 μ m puis ultracentrifugés à 100 000 g pour la purification des exosomes. Le culot a été repris dans du PBS et du tampon d'échantillon 5x. Un immunobuvardage a été réalisé sur les échantillons avec un anticorps dirigé contre le HLA-DR. Dépôt de 5 μ l/puits de lysats de CD (panneau de gauche) et 25 μ l/puits de lysats d'exosomes (panneau de droite). La quantification des exosomes a été faite avec l'anticorps anti-HLA-DR. La molécule HLA-DR est une molécule retrouvée en grande quantité dans les exosomes produites par des CD et permet donc de les quantifier [126].

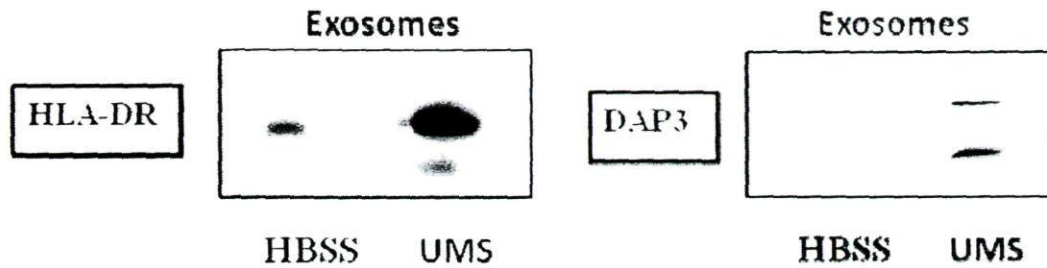


Figure 9 : Détection de la protéine DAP3 dans les exosomes des CD_s stimulées aux cristaux d'UMS (Communication personnelle Aliona Bancila et Caroline Gilbert). 5×10^5 cellules/ml sont stimulées avec des cristaux d'UMS (0,15 mg/ml final) pendant 48h à 37°C. Les surnageants sont récoltés, filtrés sur membrane de 0,22 μ m et ultracentrifugés à 100 000 g. Un immunobuvardage est réalisé sur les culots d'exosomes obtenus avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-DR et DAP3.

1.3.2.3 Molécule adaptatrice DAP3

DAP3 est une molécule GTPasique de 46 kDa qui a été identifiée comme médiateur intracellulaire de l'apoptose [145]. C'est une molécule qui permet l'association de *Fas-Associated Death Domain* (FADD) aux domaines de mort des récepteurs TRAIL et l'activation de la pro-caspase 8 [146]. Elle permet donc le déclenchement de l'apoptose par ces récepteurs (figure 10). Les récepteurs TRAIL font partie de la famille des récepteurs au TNF et sont exprimés dans les cellules T activées, les monocytes, les lymphocytes B, les macrophages stimulés avec le LPS et les CD_s activées par des cytokines [147] [148]. Il vient d'être décrit que DAP3 joue un rôle critique dans l'induction de l'apoptose induite par la stimulation du TCR [149].

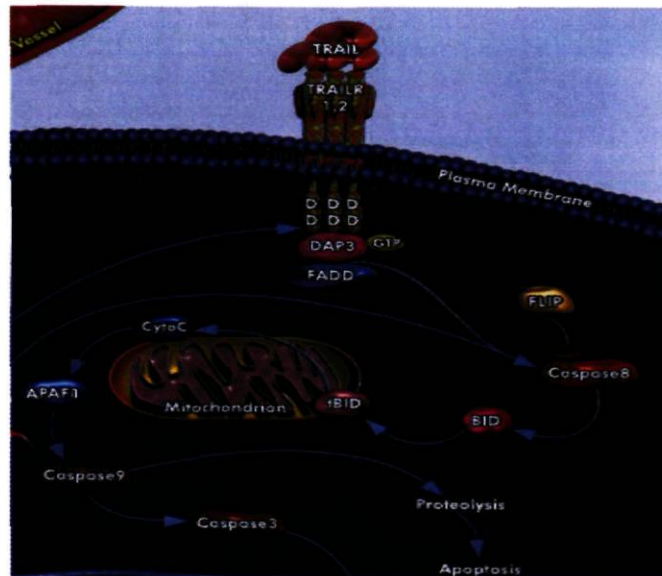


Figure 10 : Quelques voies de signalisation déclenchées à la suite de la fixation de TRAIL sur son récepteur (QIAGEN).

CHAPITRE II – Hypothèses de travail

Afin de conserver leur propre intégrité, les tissus libèrent plusieurs types de molécules modulant ainsi les réponses du système immunitaire. Cependant, un dérèglement de ces signaux peut intervenir dans le développement de plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes. Ainsi les cristaux d'UMS pourraient intervenir également comme les autres signaux dans le développement de certaines maladies, ou un endommagement des tissus a été décrit tels que l'arthrite, l'athérosclérose ou la maladie de Crohn ainsi que dans l'infection au VIH-1 provoquant ainsi un désordre de la réponse immunitaire. Il serait donc intéressant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de régulation du système immunitaire et le rôle de ces cristaux. Les résultats préliminaires obtenus au sein de notre laboratoire montrent que les cristaux d'UMS peuvent provoquer la maturation des CD80/86 également une production d'exosomes. Ils montrent également que les exosomes produits possèdent des protéines pro-apoptotiques comme DAP3. Or les exosomes peuvent influencer l'immunité et l'apoptose.

D'autre part il est décrit que le neuropeptide VIP joue un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire en tant que facteur anti-inflammatoire. Il présente plusieurs effets dont une inhibition de la maturation des CD80/86 activées par un PAMP tel que le LPS. Il se pourrait donc que ce peptide interagisse aussi avec les mécanismes d'activation du système immunitaire par un DAMP comme les cristaux d'UMS. Dans la littérature aucun lien n'a été effectué entre le VIP et les DAMPS, ni entre le VIP et la production d'exosomes par les CD80/86.

Nous souhaitons vérifier si le neuropeptide VIP inhibe la maturation des CD80/86, la libération des cytokines proinflammatoires ainsi que la libération d'exosomes en réponse aux cristaux d'UMS.

Pour répondre à cette hypothèse, trois objectifs sont proposés :

- 1) Observer l'impact du VIP sur la maturation des CD_s à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS et/ou du LPS
- 2) Évaluer l'effet du VIP sur la production de cytokines proinflammatoires par des CD_s stimulées par des cristaux d'UMS ou du LPS
- 3) Mesurer l'effet du VIP sur la production des exosomes par des CD_s stimulées par des cristaux d'UMS et évaluer la présence de DAP3 dans ces exosomes

CHAPITRE III – Matériels et Méthodes

III.1 Les réactifs

Le *Lymphocyte Separation Medium* (LSM), le *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS), le *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), les milieux de culture RPMI 1640 et *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), le *Fetal Bovine Serum* (FBS), la pénicilline, la streptomycine et la glutamine ont été achetés chez Wisent inc. (St-Bruno, QC, CAN). La primocine et le LPS ont été achetés chez Invivogen (San Diego, CA, É.U). Le GM-CSF a été acheté chez GenScript (Piscataway, NJ, É.U) tandis que l'IL-4 vient de chez R & D Systems (Minneapolis, MN, É.U). L'acutase est disponible chez Innovative Cell Technologie inc. (San Diego, CA, É.U). Les cristaux d'UMS nous ont été gracieusement offerts par le Dr Paul Naccache de l'Université Laval (Québec, QC, CAN) [150]. Le VIP provient de l'entreprise Neuropeptide (Strasbourg, Alsace, FRA). Le FBS utilisé pour l'ensemble des expériences présentées dans ce mémoire est décomplémenté et ultracentrifugé afin d'éliminer les exosomes susceptibles d'être présents.

III.2 Les anticorps

L'anticorps anti-actine (I-19) provient de chez Santa Cruz Biotechnologies inc. (Santa Cruz, CA, É.U). L'anti-HLA-DR (DA6.147) nous a été fourni par l'équipe de Michel J. Tremblay (Québec, QC, CAN). L'anticorps anti-DAP3 provient de chez BD Biosciences (Mississauga, ON, CAN). Les anticorps anti-DC-SIGN, anti-CD83, anti-CD86 et anti-CD40 proviennent de chez E.Bioscience (San Diego, CA, É.U). Les anticorps secondaires proviennent de chez Jackson Immuno Research Laboratories inc. (Baltimore, PA, É.U). Puis les anticorps utilisés pour les contrôles isotypiques tels que les anticorps anti-IgG1 (souris) et IgG2B (souris) proviennent également de chez E.Bioscience (San Diego, CA, É.U).

III.3 Cellules, stimulations et traitements

III.3.1 PBMC

Les PBMC ont été isolés à partir de sang humain sain par gradient de densité en utilisant du LSM. L'anneau de cellules mononuclées obtenu a été prélevé puis lavé 3 fois avec du HBSS1X. Les PBMC ont été ensuite mis en culture à une concentration de 5×10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de FBS et en présence d'antibiotiques tel que la pénicilline (100 U/ml), la streptomycine (100 U/ml), la primocin (100 µg/ml) ainsi que d'acide aminé, la glutamine (2 mM). Puis les PMBC ont été traités ou non avec VIP (10^{-6} M) et stimulés ou non avec des cristaux d'UMS (0.15 mg/ml) pendant 2 jours à 37°C.

III.3.2 CDs

Une sélection positive des monocytes CD14+ a été effectuée à partir des PBCM obtenus par la méthode décrite précédemment. La sélection a été réalisée grâce à des microbilles magnétiques sur lesquelles se trouve un anticorps anti-CD14 (Stem cells, Vancouver, Canada). Une fois isolé, les monocytes CD14+ ont été mis en cultures dans des plaques à 6 puits, à raison de 3×10^6 cellules/puits dans 3 ml de RPMI 1640 complet et de l'IL4 (200 U/ml) et de GM-CSF (1000 U/ml) au jour 0, 2 et 4 ont été ajoutées pour assurer leur différenciation en CDs immatures. Après 5 jours de différenciation les CDs immatures (CDi) ont été mises en culture à raison de 500 000 cellules/puits dans un volume de 500 µl en duplicata dans une plaque de 24 puits et traitées avec du VIP (10^{-6} M) puis stimulées avec des cristaux d'UMS (0.15 mg/ml) ou avec une combinaison de LPS/ INFγ (1 µg/ml / 1000 U/ml final) pendant 48h à 37°C.

III.4 Cytométrie en flux

Après 48h d'activation et de traitement, les CD8 ont été culotées et les surnageants des cultures cellulaires conservés à 4°C pour une purification ultérieure des exosomes et pour un dosage des cytokines. Après avoir compté les cellules, 200 000 cellules ont été utilisées pour une analyse en cytométrie de flux et les cellules restantes ont été conservées pour un immunobuvardage. Enfin l'analyse phénotypique des CD8 a été effectuée par cytométrie de flux en utilisant des anticorps monoclonaux conjugués au FITC dirigés contre les marqueurs CD83 ou DC-SIGN, et des anticorps monoclonaux conjugués au PE dirigés contre le marqueur CD86 ou CD40. Des contrôles isotypiques ont été également utilisés afin d'évaluer la fluorescence non spécifique.

III.5 Isolement des exosomes

Les surnageants récupérés des CD8 après 48h d'activation et de traitement, ont été centrifugés 10 min à 10 000 g puis ultracentrifugés 45 min à 100 000 g afin d'isoler les exosomes. Après l'ultracentrifugation, les surnageants ont été récupérés et conservés à -80°C pour un dosage ultérieur des cytokines alors que les culots d'exosomes ont été lavés en présence de PBS1X et de nouveau ultracentrifugés pendant 45 min à 100 000 g. Enfin, les culots obtenus ont été resuspendus dans un volume final de 190 µl avec du PBS1X.

III.6 Immunobuvardage

Les cellules et les exosomes ont été lysées dans du SB2X et SB5X (*Sample Buffer*) respectivement, et mis à migrer sur un mini-gel SDS-PAGE 12 % pendant 1h30 à 120 V. Un transfert a ensuite été effectué sur membrane PolyVinylidèneFluoride (PVDF) et une vérification du transfert a été réalisée par coloration des membranes avec du rouge ponceau. Par la suite les sites non spécifiques de la membrane ont été saturés avec du blotto 5 % pendant 30 min. Les membranes ont été ensuite incubées avec les anticorps primaires anti-

HLA-DR (1/1000) ou anti-DAP3 (1/200). Les solutions d'anticorps sont dilués dans du tampon *Tris Buffer Saline* (TBS) Tween-20 0,1 % pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes ont été lavées 3 fois 5 min avec du tampon TBS Tween-20 0,1 % puis incubées avec un anticorps secondaire anti-souris (1/10 000) dilué dans du tampon TBS Tween-20 0,1 % pendant 30 minutes à la température de la pièce. Enfin, trois lavages de 10 minutes ont été réalisés et les membranes ont été ensuite incubées avec une solution de révélation.

III.7 Dosage des cytokines proinflammatoires

Afin de doser les cytokines TNF α ou IL1 β présentes dans les surnageants récupérés à la suite de la première ultracentrifugation lors de l'isolation des exosomes, un *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (eBioscience, San Diego, CA) et une lignée indicatrice HEK-Blue™ TNF α /IL1 β (eBioscience, San Diego, CA) ont été utilisées.

III.7.1 Lignée indicatrice HEK-Blue™ TNF α /IL1 β

Les cellules HEK-Blue™ TNF α /IL1 β sont une lignée indicatrice qui permettent de détecter la présence cytokines proinflammatoires TNF α et IL1 β contenu dans le surnageant. Ces cellules sont transfectées avec un gène rapporteur *Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase* (SEAP) qui est sous le contrôle d'un promoteur NF-kB. La sécrétion de SEAP spécifique de l'activation de la voie NF-kB par le TNF α et l'IL1 β , a été mesurée en spectrophotométrie grâce à l'utilisation du réactif Quanti-Blue™ (réactif qui devient bleu/violet en présence de SEAP) [151].

III.7.2 ELISA TNF α

Le test ELISA utilisé (« *Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go !* ») de chez eBioscience est un test immuno-enzymatique permettant la détection quantitative de TNF α humain. Il a été réalisé selon les instructions du fabricant.

III.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA (*one-way ANOVA*) suivie par des tests de Tukey de comparaisons multiples. Ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel Prism 5 (GraphPad Softwar, San Diego, Californie). Les valeurs P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives. 1* = $p < 0,05$; 2* = $p < 0,01$; 3* = $p < 0,001$.

CHAPITRE IV – Résultats

IV.1 Impact du VIP sur l'activation des CD8 en présence de LPS et d'IFN γ

IV.1.1 Effet du VIP sur la maturation de CD8 activées avec le LPS et l'IFN γ

Le neuropeptide VIP agit comme un facteur anti-inflammatoire. Cependant le rôle du VIP dans la maturation des CD8 n'est pas encore totalement élucidé. Il a été décrit que le VIP inhibe l'expression des molécules coactivatrices CD80/CD86 dans des CD8 activées avec le LPS, réduisant ainsi leur capacité à activer les lymphocytes T [73].

Nous nous sommes donc intéressés à ce peptide pour ces effets observés sur les CD8 et nous avons tout d'abord vérifié ces résultats en présence de LPS et d'IFN γ . En effet l'IFN γ est une cytokine libérée par les cellules de l'immunité innée lors d'une infection et permet entre autre le changement de phénotype des CD8 immatures vers le phénotype mature [152].

Les résultats confirment que la stimulation avec le LPS et l'IFN γ provoquent une maturation des CD8 avec une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD83, CD86 et CD40. Toutefois, nous pouvons observer que le VIP diminue l'expression de CD86 sans modifier l'expression des molécules CD83 et CD40 à la suite d'une stimulation avec le LPS et l'IFN γ (Figure 11 a, b, et c).

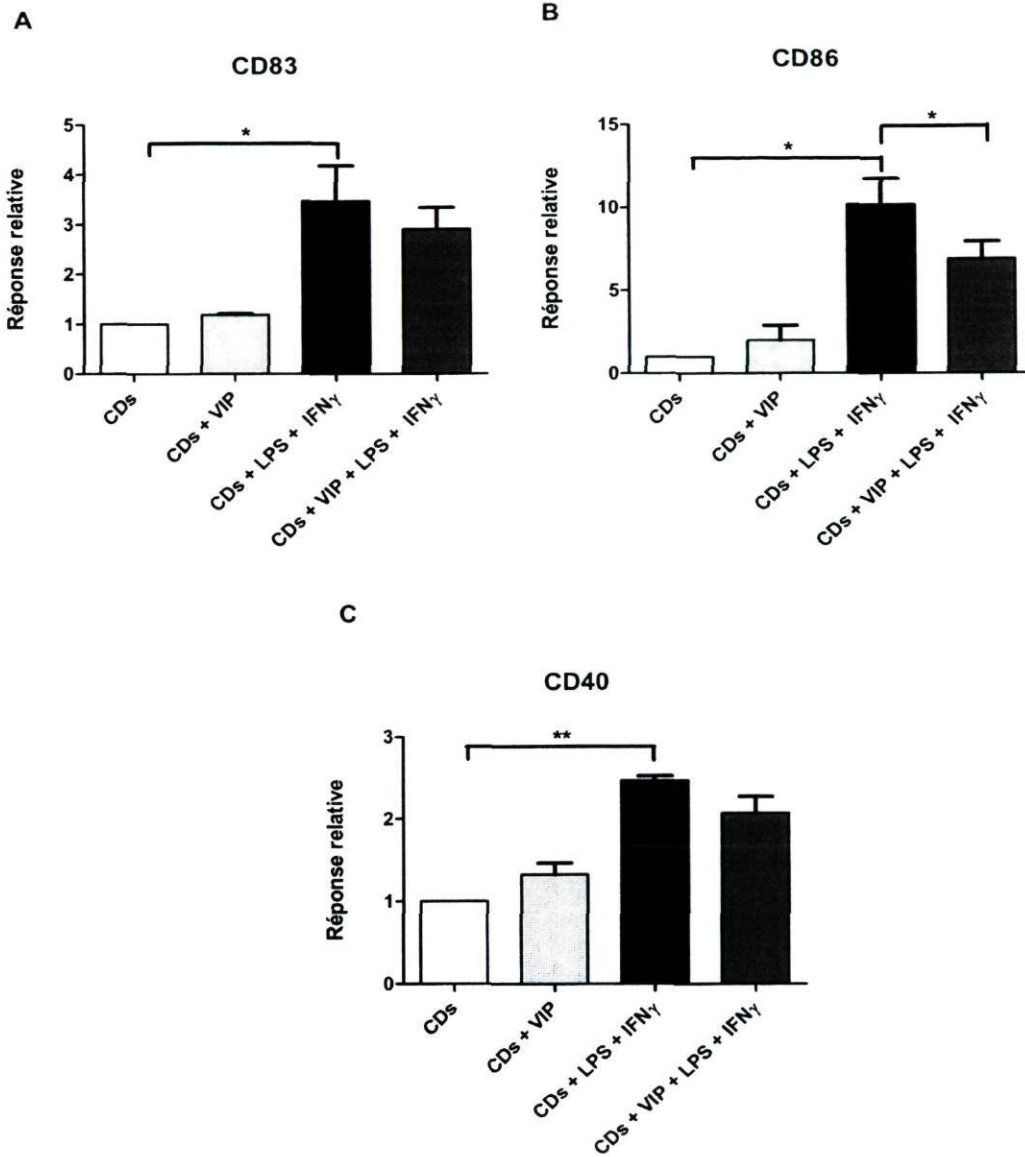


Figure 11 : Effet du VIP sur la maturation des CD4 à la suite d'une stimulation avec le LPS et l'IFN γ (5 donneurs). Les CD4 immatures (500 000 cellules/500 μ l) ont été incubées avec du milieu en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final), et/ou de LPS/IFN γ (1 μ g/ml / 1000 U/ml final) pendant 48h à 37°C. Les cellules ont été ensuite récupérées et l'expression de molécules CD83, CD86 et CD40 ont été analysée par cytométrie de flux. ** = $p < 0,01$.

IV.1.2 Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β par des CD s en réponse au LPS et à l'IFN γ

On sait que la production des cytokines TNF α /IL1 β est augmentée au sein de CD s stimulées avec le LPS et l'IFN γ [153] [154] [155] mais diminuée avec le LPS en présence de VIP [156] [157]. Toutefois, on ne sait pas si le VIP peut réguler de la libération de ces cytokines par des CD s stimulées avec le LPS et l'IFN γ . Nous nous sommes donc intéressés à étudier l'effet du VIP sur la production de cytokines pro-inflammatoires TNF α ou IL1 β . Pour se faire, des CD s ont été stimulées pendant 48h avec du LPS et de l'IFN γ , puis les surnageants ont été récupérés mis en culture avec une lignée de cellules HEK-Blue™ TNF α /IL1 β permettant de détecter la présence cytokines TNF α ou IL1 β actives.

Les résultats présentés à la figure 12 montrent que le VIP module la sécrétion de TNF α ou IL1 β par des CD s activées avec le LPS et l'IFN γ . En absence de stimulation, aucun effet du VIP n'a été sur la sécrétion des cytokines. Ces résultats ont été ensuite confirmés en utilisant ELISA pour le TNF α . Les résultats présentés à la figure 13 indiquent une diminution de la sécrétion de cette cytokine par des CD s stimulées par du LPS et de l'IFN γ en présence de VIP.

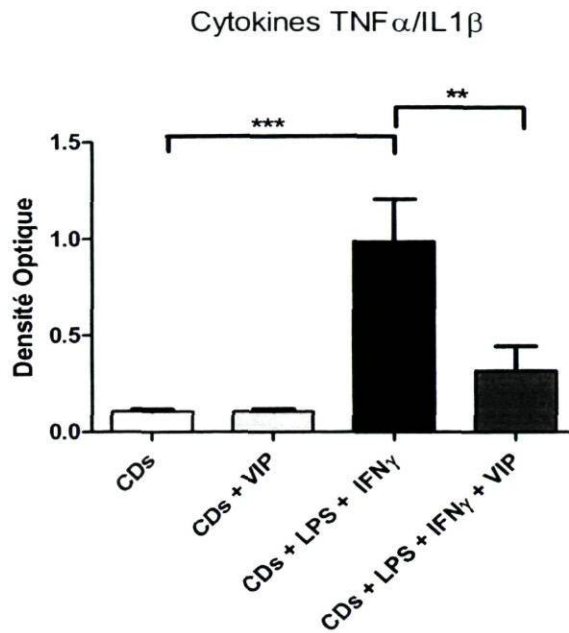


Figure 12 : Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β par des CDs à la suite d'une stimulation avec le LPS et l'INF γ . Les CDs immatures (500 000 cellules/500 μ l) ont été incubées en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final), et/ou de LPS (1 μ g/ml final) et d'INF γ (1000 U/ml final) pendant 48h à 37°C. Les surnageants ont ensuite été récupéré et mis en culture avec des cellules HEK-BlueTM TNF- α /IL-1 β (Invivogen) afin d'évaluer la quantité en TNF- α ou IL-1 β actives. ** = p<0,01 ; *** = p<0,001. (3 donneurs).

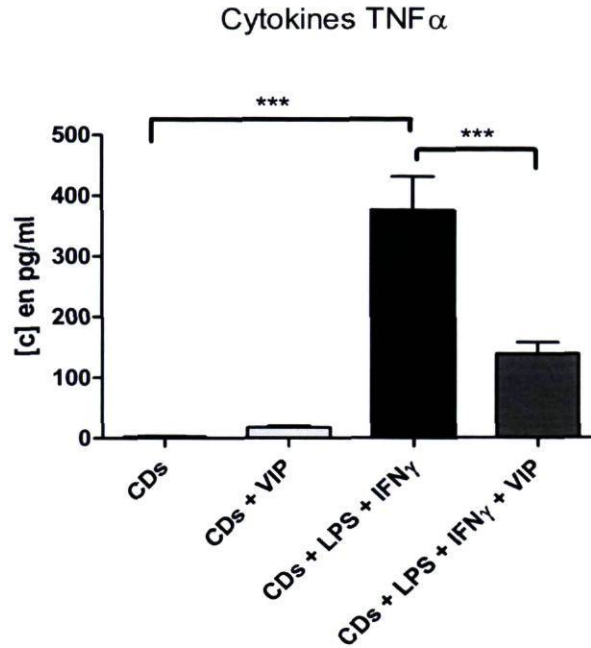


Figure 13 : Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α par des CDs à la suite d'une stimulation avec le LPS et l'IFN γ . Les CDs immatures (500 000 cellules/500 μ l) ont été incubées en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final) et/ou de LPS (1 μ g/ml final) et d'IFN γ (1000 U/ml final) pendant 48h à 37°C. Les surnageants ont été ensuite récupérés et un ELISA est réalisé afin d'évaluer la quantité en TNF α . *** = $p < 0,001$. (2 donneurs).

Pour résumer, à la suite de la stimulation des CDs avec le LPS et de l'IFN γ , le VIP diminue l'expression des molécules de costimulation CD86 au sein des CDs et la libération des cytokines pro-inflammatoires TNF α et peut-être IL1 β . Par la suite, nous avons analysé les effets de ce peptide sur la maturation de ces cellules quand celles-ci sont exposées à un DAMP comme les cristaux d'UMS.

IV.2 Impact du VIP sur l'activation des CD8 en présence de cristaux d'UMS

IV.2.1 Effet du VIP sur la maturation des CD8 activées avec des cristaux d'UMS

Dans la littérature, il a été observé que les cristaux d'UMS identifiés comme l'un des principaux signaux de danger endogènes peuvent provoquer une augmentation des molécules de costimulation CD80 et CD86 au sein des CD8 primaires dérivées de moelle osseuse de souris [108].

D'après les résultats obtenus au sein de notre laboratoire, nous avons confirmé que ces cristaux d'UMS pouvaient provoquer la maturation des CD8 humaines primaires immatures. Nous avons donc vérifié si le peptide VIP pouvait réguler l'activation de ces CD8 par les cristaux d'UMS. Les résultats préliminaires montrent une diminution de l'expression de DC-SIGN et une augmentation de CD83 et CD86 lorsque les CD8 sont stimulées avec des cristaux d'UMS. Puis en présence de VIP, nous observons une réduction de la stimulation avec une augmentation de l'expression de DC-SIGN et une légère diminution de CD83 et CD86 (figure 14). Cependant ces résultats devront être confirmés avec les cellules d'autres donneurs.

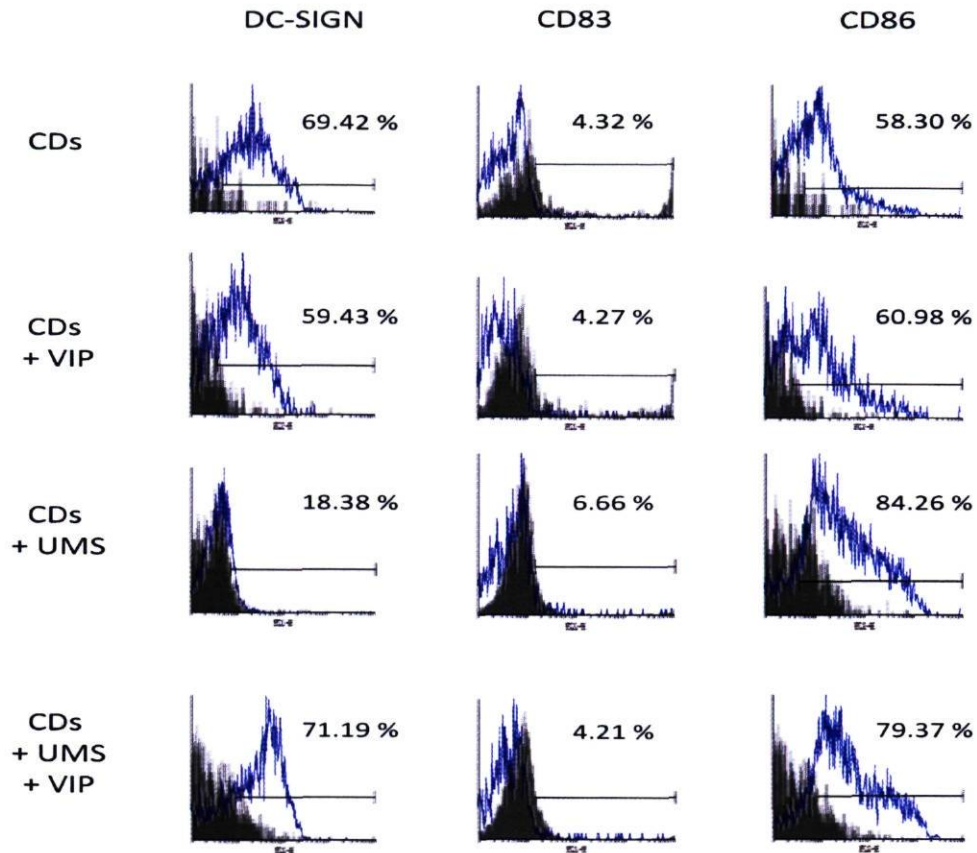


Figure 14 : Effet du VIP sur la maturation des CDs à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS. Les CDs immatures (500 000 cellules/500 μ l) ont été incubées en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final) et/ou des cristaux d'UMS (0,15 mg/ml final) pendant 48h à 37°C. Les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des molécules DC-SIGN, CD83 et CD86 ont été analysé par cytométrie de flux. (1 donneur).

IV.2.2 Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β par des PBMC et des CD8 en réponse aux cristaux d'UMS

En 2006, les travaux de Martinon et ses collaborateurs ont montré que la stimulation des macrophages par des cristaux d'UMS provoquent une augmentation de la production d'interleukines proinflammatoires IL1 β [115]. Nos résultats montrent que des PBMC activés avec des cristaux d'UMS, synthétisent une quantité plus élevée de cytokines proinflammatoires TNF α ou IL1 β actives par rapport aux PBMC non activés. Il est observé que cette augmentation en synthèse de cytokines est diminuée lorsque les PBMC stimulés avec des cristaux d'UMS sont prétraités avec du VIP. Toutefois, le VIP seul ne présente pas d'effets lorsque les PBMC ne sont pas activés (figure 15).

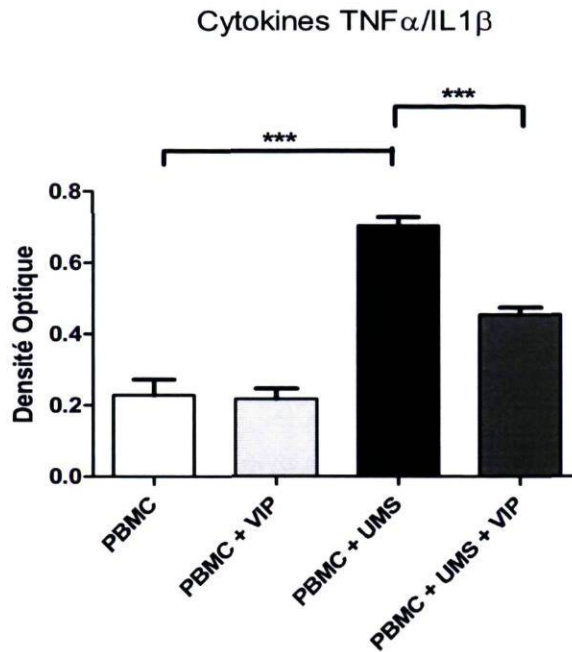


Figure 15 : Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α ou IL1 β par des PBMC à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS. Les PBMC (5×10^6 cellules/ml) ont été incubé en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final) et/ou de cristaux d'UMS (0,15 mg/ml final) pendant 48h à 37°C. Les surnageants ont ensuite été récupérés et mis en culture avec des cellules HEK-Blue™ TNF- α /IL-1 β (Invivogen) afin d'évaluer la quantité en TNF α ou IL1 β actives. *** = $p < 0,001$. (5 donneurs).

Nous avons ensuite confirmé que le VIP pouvait réduire la production de cytokines pro-inflammatoires TNF α à la suite d'une stimulation de CD4 par des cristaux d'UMS en utilisant la méthode d'ELISA (figure 16). Toutefois, nous pouvons observer que la sécrétion en TNF α est moins importante que lors d'une stimulation de CD4 par le LPS et l'IFN γ (figure 13).

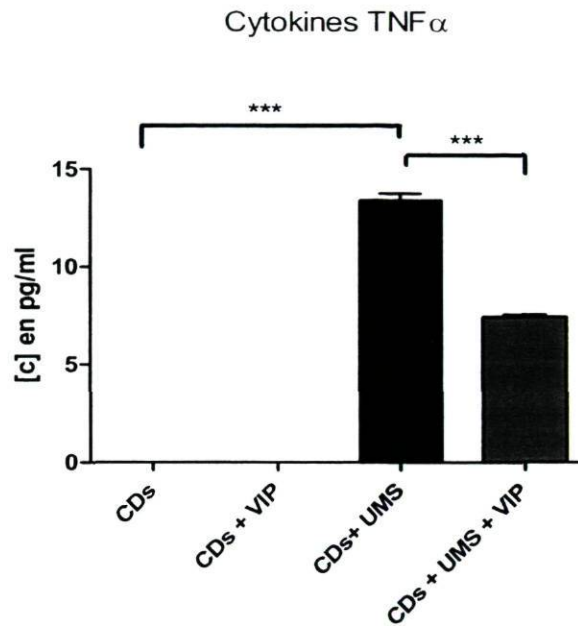


Figure 16 : Effet du VIP sur la production des cytokines TNF α par des CDs à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS . Les CDs immatures (500 000 cellules/500 μ l) ont été incubées en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final) et/ou des cristaux d'UMS (0,15 mg/ml final) pendant 48h à 37°C. Les surnageants ont ensuite été récupérés et un ELISA a été réalisé afin d'évaluer la quantité en TNF α . *** = $p < 0,001$. (1 donneur).

IV.3 Quantification et caractérisation des exosomes

IV.3.1 Quantification des exosomes produits par des CD_s stimulées avec des cristaux d'UMS et traitées avec du VIP

Pour les aider dans leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes, les CD_s relâchent de manière constitutive de grandes quantités d'exosomes dans le milieu extracellulaire [118]. Or les exosomes participent à la régulation de plusieurs fonctions du système immunitaire [134] [135].

Les résultats préliminaires obtenus au sein de notre laboratoire montrent que la maturation des CD_s stimulées avec des cristaux d'UMS est accompagnée d'une augmentation de la quantité en exosomes extracellulaires produits par les CD_s. Nous avons donc regardé si le VIP pouvait réguler la production de ces exosomes.

Les résultats présentés à la figure 17 confirment par l'intermédiaire d'un immunobuvardage avec l'anticorps anti-HLA-DR que les cristaux d'UMS provoquent la libération d'exosomes par stimulation de CD_s. En effet, nous observons la présence de protéines HLA-DR dans les échantillons d'exosomes obtenus à partir de CD_s stimulées avec des cristaux d'UMS mais pas dans les échantillons contrôles. Il est également observé que la présence de HLA-DR est diminuée lorsque les CD_s sont stimulées avec des cristaux d'UMS en présence de VIP. Ce peptide permet donc de diminuer la production d'exosomes par des CD_s stimulées avec des cristaux d'UMS. Dans le futur, il faudra confirmer ces résultats avec l'immunobuvardage avec d'autres molécules comme l'actine ou *Lysosomal-associated membrane protein 2* (LAMP2) qui sont également retrouvées en grande quantités dans les exosomes.

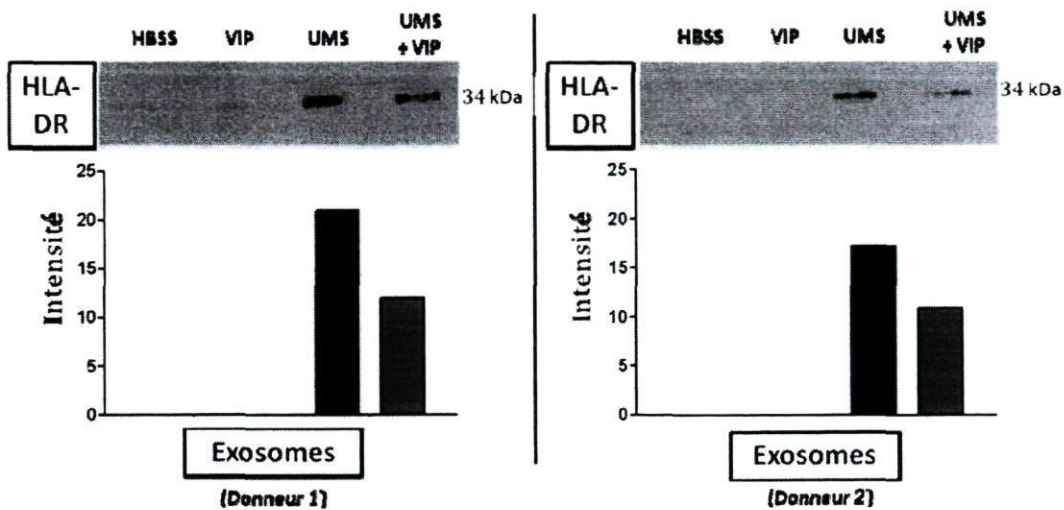


Figure 17 : Effet du VIP sur la production d'exosomes par des CD à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS . Les CD immatures (500 000 cellules/500 μ l) ont été incubées en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final) et/ou de cristaux d'UMS (0,15 mg/ml final) pendant 48h à 37°C. Les surnageants ont ensuite été récupérés, centrifugés à 10 000 g puis à 100 000 g. Les culots obtenus ont été lavés avec du PBS1X et re-ultracentrifugés à 100 000 g. Enfin un immunobuvardage a été réalisé sur les échantillons d'exosomes obtenus avec un anticorps dirigé contre la protéine HLA-DR. (3 donneurs).

IV.3.2 Caractérisation des exosomes produits par des CDs stimulées avec des cristaux d'UMS et traitées avec du VIP

Les exosomes jouent plusieurs rôles dans la régulation du système immunitaire également dans la survie cellulaire. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par la nature des différentes protéines contenues dans les exosomes. En effet les exosomes présentent un profil protéique différent en fonction du type cellulaire qui les sécrète.

Une analyse protéomique réalisée au sein de notre laboratoire sur des exosomes libérés par des CDs mises en contact avec le VIH-1 a révélé la présence de molécules pro-apoptotique telle que la protéine DAP3. Par la suite, nous avons observé que cette protéine est également présente dans des exosomes libérés par des CDs stimulées avec des cristaux d'UMS (figure 9).

Nous avons vérifié si le VIP régulait la production des exosomes par les CDs. Ensuite nous avons regardé si ce peptide pouvait également jouer un rôle sur la nature des protéines contenues dans ces exosomes comme la présence de la protéine DAP3.

Les résultats présentés à la figure 18 montrent que le VIP joue un rôle sur le profil protéique de ces exosomes. En effet, il est observé que les cristaux d'UMS provoquent une augmentation de la production d'exosomes visualisée grâce à l'anticorps anti-HLA-DR et que ces exosomes contiennent également la protéine DAP3. Ces observations confirment les résultats obtenus dans le laboratoire concernant l'effet du VIP. C'est à dire que les exosomes libérés par des CDs stimulées aux cristaux d'UMS présentent une diminution de la présence en protéines DAP3 lorsqu'elles sont traitées au VIP (Figure 18). Comme nous pouvons l'observer sur cette figure, l'intensité de la bande à 46 kDa caractéristique de la protéine DAP3 est fortement diminuée en présence de cristaux d'UMS et de VIP.

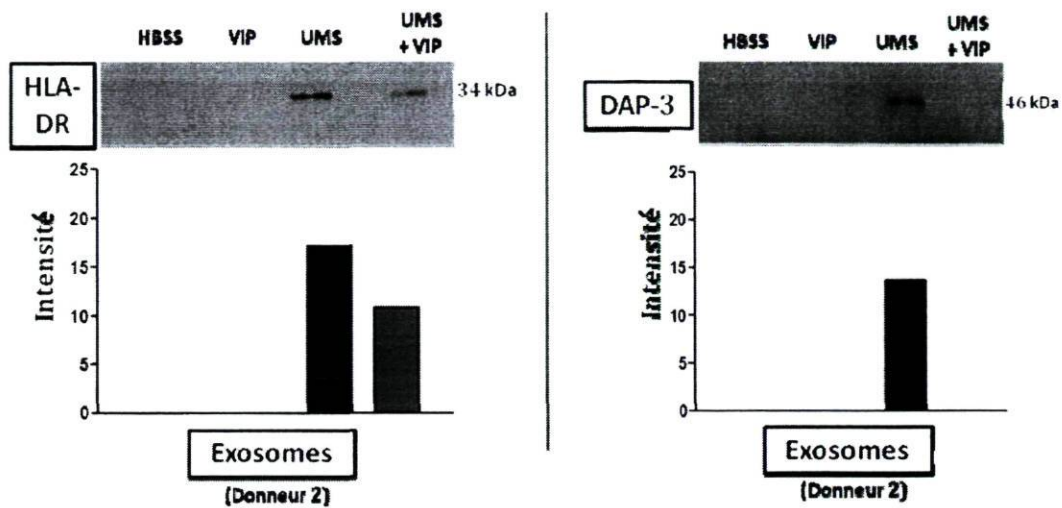


Figure 18 : Effet du VIP sur la présence de la protéine DAP3 dans les exosomes produits par des CD3 à la suite d'une stimulation avec des cristaux d'UMS . Les CD3 immatures (500 000 cellules/500 μ l) ont été incubées en présence ou en absence de VIP (10^{-6} M final) et/ou de cristaux d'UMS (0,15 mg/ml final) pendant 48h à 37°C. Les surnageants ont été ensuite récupérés, centrifugés à 10 000 g puis à 100 000 g. Les culots obtenus ont été lavés avec du PBS1X et re-ultracentrifugés à 100 000 g. Enfin un immunobuvardage a été réalisé sur les échantillons d'exosomes obtenus avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-DR et DAP3. (2 donneurs)

CHAPITRE V – Discussion

Les signaux de dangers DAMPS et PAMPS ont un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'organisme. Par exemple, il a été montré que ces signaux peuvent également présenter un rôle dans le développement de plusieurs maladies auto-immunes telles que : le psoriasis, l'arthrite, les maladies inflammatoires de l'intestin et la sclérose en plaques [162].

L'objectif de ce projet étant de comprendre les mécanismes régulant l'activation des CD80/CD86 par les DAMPS. Nous avons regardé si le peptide VIP pouvait réguler leurs effets. Plusieurs études avaient montrée que le VIP pouvait agir comme immunorégulateur sur l'activation des CD80/CD86 lorsque celles-ci sont stimulées avec des PAMPS. Nous avons montré que ce peptide régulait également l'activation des CD80/CD86 lorsque celles-ci sont stimulées par des DAMPS.

V.1 Effets du VIP sur l'activation des CD80/CD86 stimulées en présence de PAMPS :

On sait que le peptide VIP inhibe la maturation des CD80/CD86 activées en présence de LPS, grâce son effet sur la diminution de l'expression des molécules coactivatrices CD80/CD86 au sein de ces CD80/CD86 [73]. De plus le VIP réduit fortement la capacité de ces cellules stimulées avec le LPS à activer les lymphocytes T [73]. Nous avons donc cherché à confirmer ces résultats en présence d'IFN γ , car il s'agit d'une cytokine libérée par les lymphocytes T activés qui permet de renforcer l'activation et la survie des CD80/CD86 [152].

Nos résultats montrent que le LPS et l'IFN γ provoquent une maturation des CD80/CD86 avec une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40. Nous observons également que le LPS et l'IFN γ favorisent la production de cytokines

proinflammatoires TNF α ou IL1 β . Toutefois l'utilisation de la lignée indicatrice HEK-Blue™ ne permet pas de différencier les cytokines TNF α d'IL1 β . Cependant l'avantage de cette méthode de détection permet de mesurer les cytokines actives. Nous avons donc utilisé un ELISA contre le TNF α pour quantifier cette cytokine et confirmer l'augmentation de la production de cette cytokine. Ces résultats confirment les observations rapportées par différents groupes, indiquant que la production des cytokines TNF α est augmentée au sein de CD s stimulées avec LPS et IFN γ [153] [154] [155]. Il serait nécessaire de compléter dans le futur ces expériences avec un ELISA permettant de doser l'IL1 β .

Enfin, nous observons que cette activation peut être diminuée en présence de VIP. En effet, l'impact du VIP observé sur l'activation des CD s , est que ce peptide permet de bloquer la production des cytokines TNF α IL1 β . Nos résultats montrent aussi que ce peptide diminue l'expression de molécules coactivatrices CD86, ce qui confirme les résultats observés par Delgado à propos de l'effet du VIP sur cette molécule [73]. Toutefois nous observons que ce peptide ne modifie presque pas ou que très légèrement l'expression des molécules coactivatrices CD83 et CD40.

V.2 Modulation par le VIP de l'activation de CD s stimulées en présence de DAMPS :

Lors d'endommagement tissulaire, les cellules en nécrose peuvent libérer des signaux de danger endogènes nommés DAMPS et activer la réponse immunitaire [104]. Nous avons par conséquent regardé si le VIP pouvait également présenter un effet sur la maturation des CD s quand celles-ci sont exposées à des signaux de danger endogènes.

Les DAMPS libérés peuvent être des molécules comme : HMGB1, S100A8/S100A9, des protéines de choc thermique, de l'ADN, de l'ATP ou de l'acide urique. La dégradation de

la matrice extracellulaire peut également libérer des DAMPS comme l'héparan sulfate et des fragments d'acide hyaluronique [106] [107] [114] [163].

Nos résultats confirment que les cristaux d'UMS déclenchent la maturation des CD avec une diminution de l'expression de DC-SIGN et une augmentation de l'expression de CD83 et CD86. Nous avons vu également que ces cristaux peuvent déclencher une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires TNF α ou IL1 β par des PBMC humains et de TNF α par des CD humaines. Toutefois la quantité de TNF α produite par les CD est moindre que lors d'une stimulation avec du LPS et de l'IFN γ . Il serait donc nécessaire dans des expériences ultérieures de mesurer si les cristaux d'UMS peuvent de même déclencher une augmentation de la production en IL1 β par des CD humaines.

Nous avons vu auparavant que le VIP pouvait présenter un rôle inhibiteur dans l'activation de CD par des PAMPS. Nous avons donc vérifié si ce peptide pouvait présenter également un impact sur l'activation des cellules de l'immunité lorsque celle-ci sont stimulées avec des DAMPS. Les résultats obtenus montrent que le peptide VIP diminue les modulations provoquées par l'ajout des cristaux d'UMS. En effet la diminution de l'expression de DC-SIGN est plus modeste et l'augmentation de l'expression de CD83 et CD86 au sein des CD aussi. Toutefois ces résultats restent à être confirmés avec plusieurs autres donneurs.

V.3 Effets du VIP et des cristaux d'UMS sur la production des exosomes et leurs caractérisations :

Les résultats obtenus montrent que des CD stimulées avec des cristaux d'UMS produisent une grande quantité d'exosomes ayant incorporés le HLA-DR. Ces résultats laissent penser que ces exosomes pourraient jouer un rôle dans la présentation antigénique et donc dans l'amplification de la réponse immunitaire.

Outre la capacité des exosomes à stimuler les réponses immunitaires, plusieurs études ont suggéré que les exosomes peuvent également supprimer ces réponses [139] [143]. En effet, il a été montré que des cellules cancéreuses pouvaient produire des exosomes contenant une molécule proapoptotique FasL et que ces exosomes avaient la capacité d'induire l'apoptose des LT-CD4+ [139]. De plus, d'autres études ont montré que les exosomes produits par des LT-CD4+ suractivées et donc sensible à l'AICD sont enrichis en molécules proapoptotiques FasL et APO2L (TRAIL) [143]. Or ces deux molécules sont connues pour être des médiateurs permettant d'éliminer les lymphocytes T suractivés par AICD.

Nous observons la présence de HLA-DR produits dans les exosomes par les CDs stimulées aux cristaux d'UMS. Le HLA-DR pourrait peut-être intervenir dans la sur-activation des LT-CD4+ en activant le TCR, sensibilisant les cellules à l'AICD. Cette sensibilisation pourrait être favorisée par la présence au sein des exosomes de la molécule DAP3. De plus la présence de cette protéine pourrait être spécifique de la stimulation par les cristaux d'UMS. En effet d'après des résultats obtenus au sein de notre laboratoire, une stimulation des CDs avec des PAMPS comme le LPS provoque une augmentation de la production des exosomes mais celles-ci ne contiennent pas le DAP3.

Ainsi les exosomes produites à la suite d'une stimulation des CDs avec des cristaux d'UMS, pourraient stimuler les LT-CD4+ et également prédisposer ou sensibiliser ces cellules à l'apoptose. Toutefois, ces effets pourraient être diminués en présence de VIP. Effectivement, nos résultats montrent également que le VIP peut réguler la production de ces exosomes et conséquemment la présence de DAP3 en réponse aux cristaux d'UMS. Le VIP pourrait inhiber la présentation antigénique par les exosomes et donc sur l'activation des LT-CD4+ car il permet de réduire la quantité d'exosomes produites dans le milieu extracellulaire. Il serait intéressant dans le futur d'étudier ces effets en récupérant des exosomes libérés à partir de CDs stimulées avec des cristaux d'UMS et en réalisant une co-culture de ces exosomes avec des LT-CD4+ et de mesurer l'apoptose.

Enfin la libération d'ATP pourrait peut-être permettre d'expliquer l'inhibition des réponses aux cristaux par le VIP. Il a été observé dans la littérature que ces cristaux avaient besoin de la présence d'autres signaux de danger comme le nucléotide ATP [165]. En effet une étude a montré que l'ATP ainsi qu'un de ses récepteurs, le P2Y₂ sont nécessaires pour que les éosinophiles libèrent des protéines granulaires et des cytokines proinflammatoires tels que l'IL6 et l'IL8 en réponse aux cristaux d'UMS [165]. L'ATP est libérée par les éosinophiles dans le milieu extracellulaire à la suite d'une activation par les cristaux d'UMS et agit sur le récepteur P2Y₂. Ainsi le VIP pourrait diminuer la libération du nucléotide ATP, des protéines granulaires et des cytokines proinflammatoires. La diminution de la libération de l'ATP par le VIP, permettrait d'expliquer les mécanismes impliqués dans la libération des cytokines proinflammatoires et régulés par ce peptide.

CHAPITRE VI – Conclusions et Contributions du projet

Les CD83, CD86 et CD40 sont importantes dans l'élimination des pathogènes et des débris cellulaires, ainsi qu'également dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. En effet nous observons qu'en présence de PAMPS et de DAMPS, les CD83, CD86 et CD40 subissent une maturation et sont donc susceptibles de présenter un antigène. Nos résultats montrent que le LPS et l'IFN γ , ainsi que les cristaux d'UMS provoquent une maturation des CD83, CD86 et CD40. En effet, nous observons que le LPS et l'IFN γ déclenchent une augmentation de l'expression des molécules CD83, CD86 et CD40, tandis que les cristaux d'UMS déclenchent une augmentation de l'expression des molécules CD86 et HLA-DR. Ces deux types de signaux entraînent également une augmentation de la production des cytokines proinflammatoires TNF α ou IL1 β actives.

D'autre part, les présents travaux confirment que les cristaux d'UMS déclenchent une augmentation de la production d'exosomes par les CD83, CD86 et CD40 et la présence de molécules pro-apoptotiques DAP3 au sein de ces microvésicules.

Enfin nous avons mis en évidence que le neuropeptide VIP pouvait réguler l'activation des CD83, CD86 et CD40 stimulées par du LPS et IFN γ , ou des cristaux d'UMS. Effectivement, ce peptide permet de diminuer l'augmentation de l'expression de la molécule CD86, la production des cytokines TNF α ou IL1 β actives et la production d'exosomes à la suite d'une activation par ces différents signaux.

Il est montré que ces signaux peuvent présenter un rôle dans le développement de plusieurs maladies auto-immunes et il se pourrait qu'ils interviennent également dans les infections

virales comme une infection à VIH-1. Il faudrait approfondir nos connaissances sur le rôle de la molécule VIP dans la libération des exosomes ainsi que dans l'impact des signaux de danger pourraient permettre à long terme d'envisager des nouvelles stratégies concernant le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes, et également l'infection au VIH-1.

CHAPITRE VII – Perspectives

Plusieurs perspectives de recherche apparaissent à l'issue de cette maîtrise. À court terme, il serait intéressant de regarder l'effet des exosomes produites par des CDs stimulées avec des cristaux d'UMS en présence ou non de VIP sur des LT-CD4+. L'hypothèse serait que les exosomes pourraient activer une prolifération des LT-CD4+ ou induire une apoptose. À partir de ces exosomes, on pourrait également étudier leur effet sur la migration des CDs et des LT-CD4+. Une caractérisation protéique plus approfondie de ces exosomes pourrait également être effectuée.

Nous avons observé que les cristaux d'UMS provoquent la maturation des CDs. D'autres expériences pourraient être mises en place afin d'étudier l'impact d'autres signaux de dangers endogènes sur la maturation et sur la migration de ces cellules. Il faudrait aussi vérifier si le VIP et d'autres peptides connus pour avoir un rôle anti-inflammatoire comme les endomorphines 1 et 2, ou l'*alpha-Melanocyte Stimulating Hormone* (α -MSH) régulent les effets de ces différents signaux de dangers endogènes.

VII.1 Rôles possibles du VIP et des signaux de danger dans le contexte d'une infection :

VII.1.1 Rôles des CD4 et rôle possible du VIP lors d'une l'infection comme dans le cas d'une infection au VIH-1 :

Nous avons vu dans l'introduction que le VIP joue un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire en agissant à la fois comme un facteur anti-inflammatoire dans l'immunité innée et en favorisant la réponse Th2 dans l'immunité adaptative. En effet, ce peptide diminue la migration ou l'activation des CD4, des LT-CD4+ ou des macrophages en présence d'un PAMP [176] [177] [96] [97] [88] [75] [73] [80]. Toutefois toutes ces fonctions sont retrouvées affectées lors d'une infection au VIH-1 [176] [177] [178], ce qui signifierait que le VIH-1 pourrait diminuer la présence ou les fonctions du VIP.

L'une des cellules immunitaires jouant un rôle important lors d'une infection par le VIH-1 est la CD [176] [177]. Lors d'une infection par le VIH-1, ces cellules permettent de capter les particules virales dans les tissus génitaux et les véhiculent ensuite vers les tissus lymphoïdes secondaires où elles transfèrent ces particules aux LT-CD4+ [176] [177]. Les CD4 sont dotées sous leur forme immature d'une capacité à endocyter des antigènes et phagocytter des pathogènes comme les virus ou les bactéries. La liaison et l'internalisation de pathogènes tel le VIH-1 par les CD4 peuvent se faire par l'intermédiaire de différents récepteurs incluant le CD4, les CCR3, CCR5, CCR8 et CCR9 (*CC-Chemokine Receptor*), ou les CXCR4 et CXCR6 (*CXC-Chemokine receptor*) [179] [180]. Les CD4 expriment également d'autres récepteurs qui peuvent lier le VIH-1 tel que des PRRs comme les TLRs ou des lectines de type C comme le *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN) ou le *Dendritic Cell ImmunoReceptor* (DCIR) [181] [182] [183]. Les récepteurs lectines de types C comme le DC-SIGN et le DCIR participent au mode trans-infection [176] [184]. En présence de virus, la liaison de DC-SIGN avec le VIH-1 par l'intermédiaire d'une fixation avec la GP120 provoque une internalisation du virus dans le compartiment endosomal précoce, où il n'est pas dégradé

[185] [186]. Ce mécanisme permet de disséminer le virus et de le protéger de l'immunité antivirale.

Cette migration des CD4 vers les organes lymphoïdes secondaires où elles transfèrent les virus aux LT-CD4+ pourrait être inhibé par un neuropeptide produit par l'innervation : le peptide VIP. Effectivement, il a été observé que ces neuropeptides peuvent affecter la migration des CD4 d'une façon dose-dépendante en réponse à des chemokines CCL5 et CCL19 vers les organes lymphoïdes secondaire afin de prévenir une réponse immunitaire [75].

VII.1.2 Rôles des récepteurs du VIP dans l'infection par le VIH-1 :

D'autres récepteurs ont été identifiés comme pouvant être susceptible de lier le VIH-1 tel que le récepteur du VIP nommé VPAC1 couplé aux protéines G. En effet, le virus pourrait activer VPAC1 étant donné qu'il existe une homologie de séquence entre la GP120 du VIH-1 et le VIP [188] [187]. Or ce récepteur peut être internalisé à la suite de la liaison du VIP [189]. Ainsi il se pourrait que VPAC1 lie le VIH-1, ce qui aboutirait également à une internalisation du virus dans les compartiments endosomaux précoces comme le fait le DC-SIGN. Il faudrait réaliser des expériences afin de vérifier si VPAC1 lie le VIH-1 et l'internalise, et si ce récepteur participe aussi à la trans-infection. Dans le cas où ces hypothèses seraient vérifiées, nous pourrions également étudier les effets de la présence du VIP dans la compétitivité vis à vis de ces récepteurs avec le VIH-1. En effet, la présence de ce peptide pourrait être altérée lors d'une infection au VIH-1.

De nombreuses hypothèses peuvent être formulées dans l'éventualité que le VIH-1 lie VPAC1 à savoir si l'affinité de liaison du virus avec ce récepteur est plus ou moins

importante par rapport au ligand naturel qui est le VIP? Ou encore existe-t-il d'autres peptides que le VIP qui pourraient fixer VPAC1 et dont leurs présences pourraient être également altérées lors d'une infection au VIH-1?

D'autre part, le récepteur VPAC1 peut jouer également un rôle dans la *cis*-infection des LT-CD4⁺. Effectivement, l'utilisation d'anticorps dirigés contre ce récepteur dans les lymphocytes T provoque une diminution de l'infection au VIH-1 alors qu'une activation spécifique du récepteur VPAC1 dans les cellules primaires telles que les PBMC provoque une augmentation de l'infection au VIH-1 [187]. Cependant une activation de VPAC1 par VIP ne déclenche pas d'augmentation de la *cis*-infection mais celle-ci est déclenchée en présence d'un autre peptide appartenant à la famille VIP qui est la sécrétine [187]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la sécrétine présente une plus forte affinité de liaison pour le récepteur VPAC1 par rapport à VPAC2, contrairement au VIP qui elle, lie VPAC1 et VPAC2 avec une même affinité [190] [191].

Le VIH-1 pourrait donc présenter une plus forte affinité pour VPAC1 comme la sécrétine, ce qui favoriserait ainsi l'infection de la cellule (figure 18). Toutefois, nous avons vu que la GP120 du VIH-1 présente une séquence similaire avec VIP. Alors comment se fait-il que le VIH-1 activerait seulement VPAC1 et pas VPAC2? De plus, dans les travaux de Branch et ces collaborateurs, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre VPAC1 inhibe considérablement l'infection virale en *cis* de plus de 80 % [187]. VPAC1 pourrait donc jouer un rôle important lors d'une infection au VIH-1. En revanche lorsqu'ils utilisent un anticorps dirigé contre VPAC2, aucun effet n'est cette fois-ci observé [187].

D'autre part si le VIH-1 activerait VPAC2, cela pourrait se retourner contre lui. En effet, une stimulation de VPAC2 avec un agoniste spécifique tel que l'hélodermine peut provoquer une forte résistance à l'infection au VIH-1 [192] (figure 19). Ainsi, lors d'une

infection par le VIH-1, la présence de la sécrétine pourrait être augmentée et celle de l'hélocrine diminuée, favorisant ainsi l'invasion du virus.

Finalement, les récepteurs VPAC1 et VPAC2, et leurs ligands pourraient jouer un rôle à la fois dans la *trans* et la *cis*-infection. D'ailleurs des anticorps présent chez les patients infectés par le VIH-1 ont été identifiés comme pouvant fixer le VIP et le domaine C terminal non immunogénique de la gp120 du VIH-1. Or une corrélation entre le titre en auto-anticorps reconnaissant VIP, le domaine C terminal de la gp120 et la progression de la maladie indique que ces anticorps pourraient être un facteur important dans le contrôle de la maladie [193] [194].

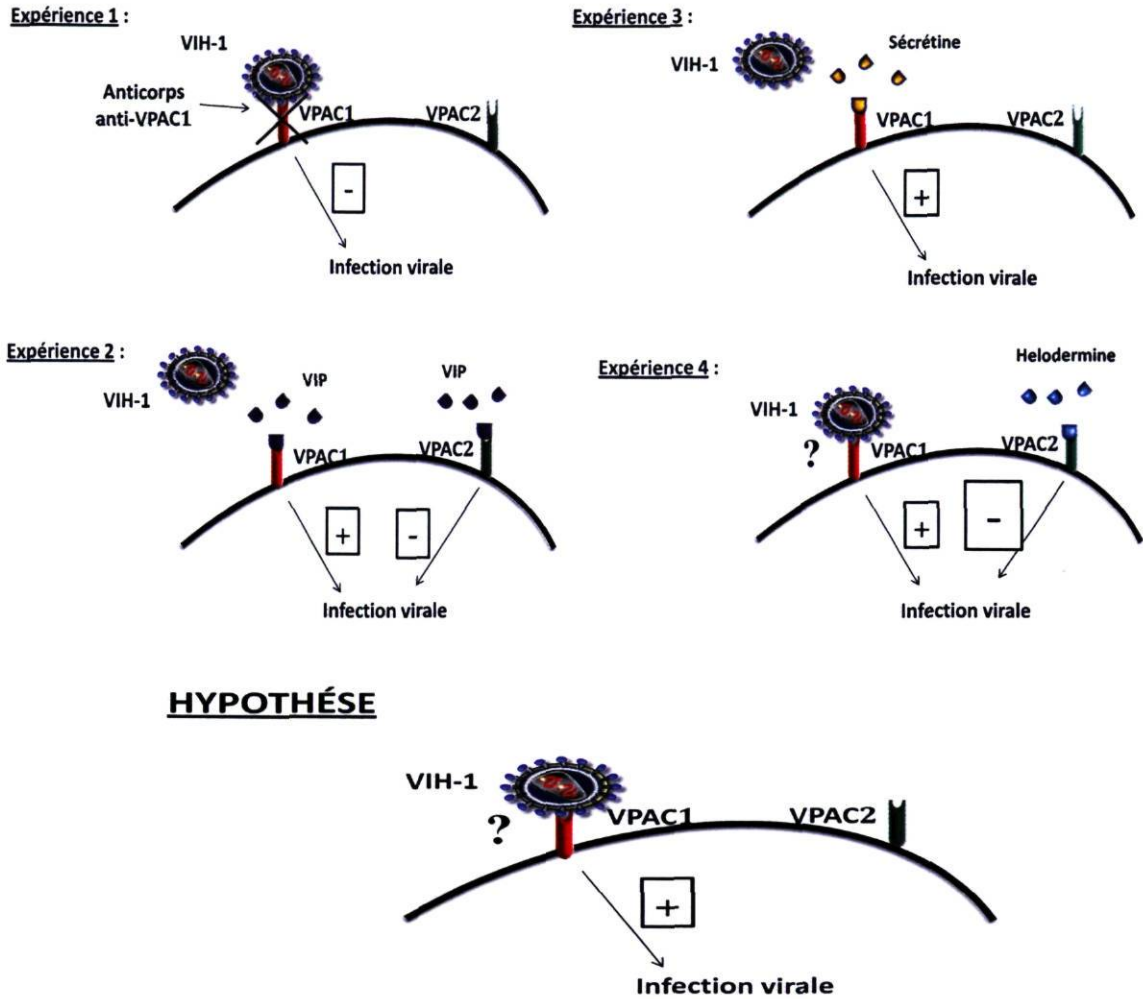


Figure 19 : Rôles des récepteurs VPAC1 et VPAC2 dans la *cis*-infection au VIH-1, et hypothèses (Personnelles).

VII.1.3 Rôles possibles des PAMPS, des DAMPS et du VIP dans la déplétion des LT-CD4+ :

Rapidement après l'infection par le VIH-1 (15 jours), les LT-CD4+ sont en grande partie éliminés au sein du GALT et ne peuvent participer efficacement à l'élaboration de la réponse immunitaire [195] (figure 20).

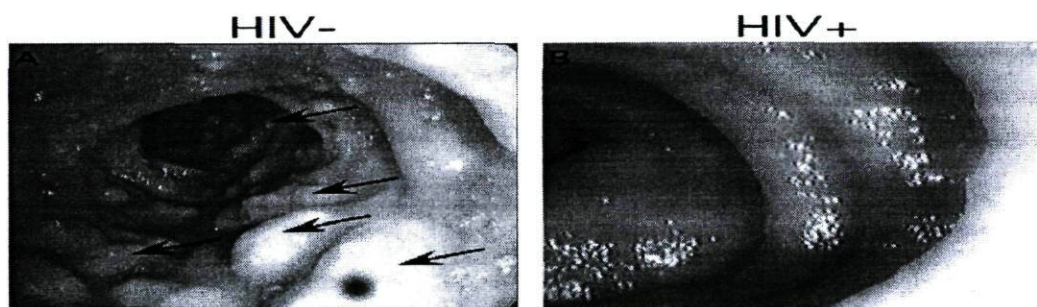


Figure 20 : Endoscopie du tractus gastro-intestinal 15 jours après le début de l'infection au VIH-1 [195].

Les mécanismes participants à la diminution rapide et drastique des LT-CD4+ lors de la primo-infection ne sont pas encore tous élucidés. Outre le fait que l'infection par le VIH-1 elle-même détruit les cellules, d'autres facteurs pourraient aussi influencer cette déplétion massive en LT-CD4+ (figure 21).

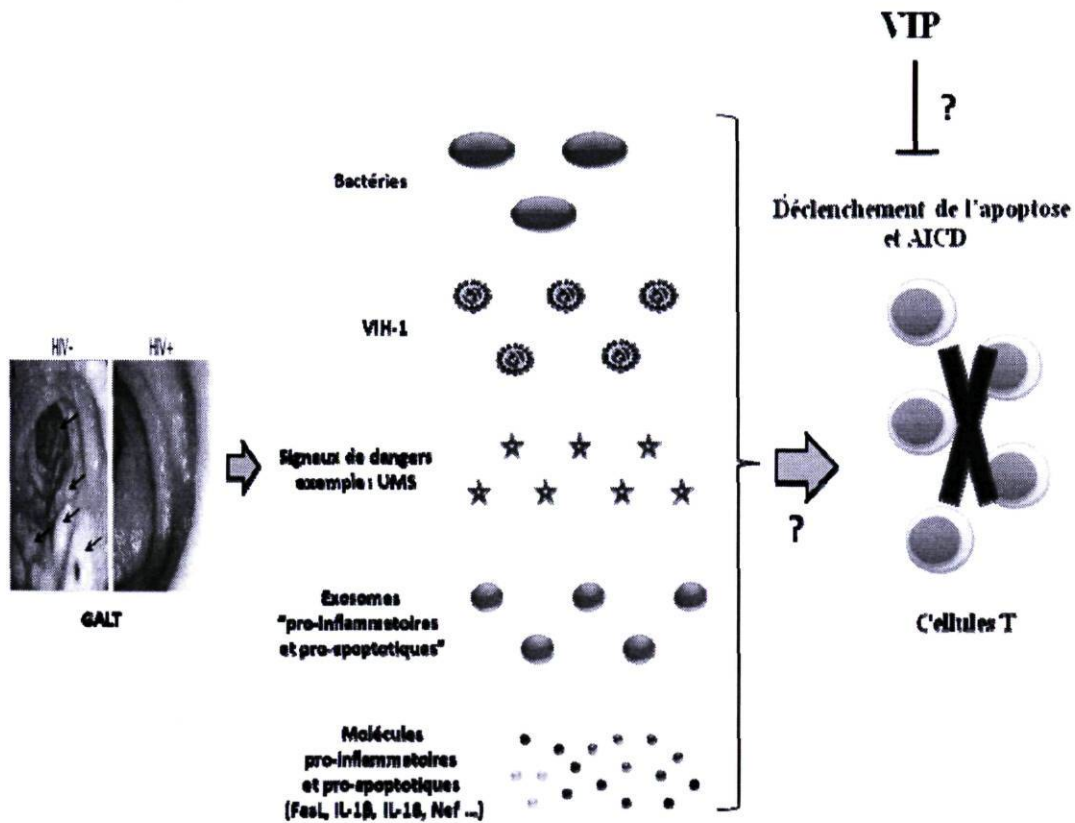


Figure 21 : Facteurs susceptibles d'être impliqués dans la déplétion des LT-CD4+ du GALT (Personnelle).

Des observations préliminaires dans notre laboratoire ont montré que les CD4 en contact avec le VIH-1 pouvaient libérer des microvésicules très semblables au virus : les exosomes. De plus, notre laboratoire a observé que ces exosomes contiennent des protéines pro-apoptotiques DAP3 qui pourraient présenter un rôle dans l'apoptose des cellules cibles. Mes résultats montrent que des CD4 stimulées par des signaux de dangers endogènes comme les cristaux d'UMS qui sont aussi susceptibles d'être retrouvés lors de l'endommagement du tractus gastro-intestinal (GALT), produisent également des exosomes en plus grande quantité et que les exosomes possèdent la molécule DAP3. La participation à la déplétion des LT-CD4+ par les cristaux d'UMS pourrait donc se réaliser par les

cristaux eux-mêmes, et également par l'intermédiaire des exosomes. Également, il vient d'être montré que la réplication virale au sein de CD4 infectées par le VIH-1 est dépendante de la présence de cellules NKs et de signaux de dangers endogènes tels que le HMGB1 [196]. Les cristaux d'UMS pourraient-ils présenter de même un effet sur la réplication du VIH-1?

Toutefois, d'autres facteurs pourraient aussi influencer la déplétion des LT-CD4+, comme les signaux de dangers exogènes tels que des PAMPS de bactéries de la flore intestinale qui auraient pénétré dans les tissus.

Parmi les PAMPS, du LPS pourrait être retrouvé dans le GALT endommagé lors de l'infection au VIH-1. En effet, plusieurs centaines de milliards de bactéries de la flore intestinale tapissent normalement l'intestin dans les conditions physiologiques [197]. Or il est observé que du LPS est présents en grande quantité dans la circulation sanguine des patients infectés par le VIH-1. Cette présence de LPS dans le sang pourrait être la conséquence d'une translocation microbienne suite à l'endommagement du GALT et de l'épithélium intestinal [198] [199] [195] [200]. Ainsi des bactéries pourraient être retrouvées dans le GALT et participeraient à la déplétion des LT-CD4+. Cette déplétion serait provoquée à la suite d'une activation chronique du système immunitaire par le LPS ou d'autres motifs bactériens. En effet, une corrélation entre l'augmentation de LPS et l'activation chronique du système immunitaire inné et adaptatif [200].

Cette déplétion pourrait être aussi favorisée par une altération de la quantité et de la fonction du VIP qui est normalement retrouvé en grande quantité dans le GALT à l'état physiologique et qui contribue à la tolérance [201].

Également, nous avons montré pour la première fois que la sécrétion des exosomes par des CD4 pouvait être altérée, et ceci par l'entremise du peptide VIP. En effet, une stimulation des CD4 par des cristaux d'UMS provoque une maturation des cellules et une augmentation

de la production d'exosomes. Cependant en présence de VIP, cette maturation de CD4 et la production d'exosomes est diminuée. Le VIP pourrait donc présenter un effet protecteur vis-à-vis de la sensibilisation des LT-CD4+ par rapport à l'AICD d'autant plus que nous observons que le VIP diminue également la présence de molécules proapoptotiques tel que DAP3 au sein des exosomes. De plus le VIP inhibe l'AICD dans les lymphocytes T [202].

A long terme, des expériences avec le VIP pourraient être réalisées afin d'étudier son effet sur la migration des CD4 et les lymphocytes infectés par le VIH-1 ou par un autre pathogène. Des expériences permettant d'étudier la fixation du VIH-1 sur VPAC1 ou VPAC2, et s'ils présentent un rôle dans la *trans*-infection serait intéressant de mettre en place.

CHAPITRE VIII - Références

1. Said, S.I. and V. Mutt, *Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine*. Science, 1970. **169**(951): p. 1217-8.
2. Henning, R.J. and D.R. Sawmiller, *Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(1): p. 27-37.
3. Said, S.I. and R.N. Rosenberg, *Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue*. Science, 1976. **192**(4242): p. 907-8.
4. Delgado, M. and D. Ganea, *Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine?* J Immunol, 2001. **166**(5): p. 2907-12.
5. Sherwood, N.M., S.L. Krueckl, and J.E. McRory, *The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily*. Endocr Rev, 2000. **21**(6): p. 619-70.
6. Tsukada, T., et al., *Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene*. DNA, 1985. **4**(4): p. 293-300.
7. Gozes, I., et al., *The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21---6qter*. Hum Genet, 1987. **75**(1): p. 41-4.
8. Hayakawa, Y., et al., *Cyclic AMP regulation of pro-vasoactive intestinal polypeptide/PHM-27 synthesis in human neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 1984. **259**(14): p. 9207-11.
9. Ohsawa, K., et al., *Synergistic stimulation of VIP/PHM-27 gene expression by cyclic AMP and phorbol esters in human neuroblastoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **132**(3): p. 885-91.
10. Tsukada, T., et al., *Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP*. J Biol Chem, 1987. **262**(18): p. 8743-7.
11. Yamagami, T., et al., *Complete nucleotide sequence of human vasoactive intestinal peptide/PHM-27 gene and its inducible promoter*. Ann N Y Acad Sci, 1988. **527**: p. 87-102.
12. Fink, J.S., et al., *Cyclic AMP- and phorbol ester-induced transcriptional activation are mediated by the same enhancer element in the human vasoactive intestinal peptide gene*. J Biol Chem, 1991. **266**(6): p. 3882-7.
13. Waschek, J.A., C.M. Hsu, and L.E. Eiden, *Lineage-specific regulation of the vasoactive intestinal peptide gene in neuroblastoma cells is conferred by 5.2 kilobases of 5'-flanking sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9547-51.
14. Hahm, S.H. and L.E. Eiden, *Cis-regulatory elements controlling basal and inducible VIP gene transcription*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **865**: p. 10-26.
15. Liu, D., et al., *VIP gene transcription is regulated by far upstream enhancer and repressor elements*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(1): p. 211-8.
16. Itoh, N., et al., *Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27*. Nature, 1983. **304**(5926): p. 547-9.
17. Nishizawa, M., et al., *Nucleotide sequence divergence and functional constraint in VIP precursor mRNA evolution between human and rat*. FEBS Lett, 1985. **183**(1): p. 55-9.
18. Bloom, S.R., et al., *Diarrhoea in vipoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by single coding gene*. Lancet, 1983. **2**(8360): p. 1163-5.

19. Harmar, A.J., et al., *International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. *Pharmacol Rev*, 1998. **50**(2): p. 265-70.
20. Martin, B., et al., *Class II G protein-coupled receptors and their ligands in neuronal function and protection*. *Neuromolecular Med*, 2005. **7**(1-2): p. 3-36.
21. Laburthe, M., et al., *Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor*. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. **805**: p. 94-109; discussion 110-1.
22. Ishihara, T., et al., *Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide*. *Neuron*, 1992. **8**(4): p. 811-9.
23. Sreedharan, S.P., et al., *Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **193**(2): p. 546-53.
24. Sreedharan, S.P., et al., *Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(7): p. 2939-43.
25. Usdin, T.B., T.I. Bonner, and E. Mezey, *Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions*. *Endocrinology*, 1994. **135**(6): p. 2662-80.
26. Vertongen, P., et al., *Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **865**: p. 412-5.
27. Vaudry, D., et al., *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(2): p. 269-324.
28. Reubi, J.C., *In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **921**: p. 1-25.
29. Guerrero, J.M., et al., *Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 1981. **21**(2): p. 151-60.
30. Wiik, P., P.K. Opstad, and A. Boyum, *Binding of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by human blood monocytes: demonstration of specific binding sites*. *Regul Pept*, 1985. **12**(2): p. 145-53.
31. Ottaway, C.A. and G.R. Greenberg, *Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and the modulation of mitogen responses*. *J Immunol*, 1984. **132**(1): p. 417-23.
32. Sakakibara, H., K. Shima, and S.I. Said, *Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors on rat alveolar macrophages*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(3 Pt 1): p. L256-62.
33. Delgado, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases*. *J Mol Med*, 2002. **80**(1): p. 16-24.
34. Harfi, I., et al., *Regulation of human polymorphonuclear leukocytes functions by the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide after activation of MAPKs*. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 4154-63.
35. Shimozato, T. and P.W. Kincade, *Indirect suppression of IL-7-responsive B cell precursors by vasoactive intestinal peptide*. *J Immunol*, 1997. **158**(11): p. 5178-84.
36. Lutz, E.M., et al., *Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP*. *Mol Cell Neurosci*, 2006. **31**(2): p. 193-209.

37. Svoboda, M., et al., *Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **205**(3): p. 1617-24.
38. Lutz, E.M., et al., *Structure of the human VIPR2 gene for vasoactive intestinal peptide receptor type 2*. *FEBS Lett*, 1999. **458**(2): p. 197-203.
39. Sheward, W.J., E.M. Lutz, and A.J. Harmar, *The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization*. *Neuroscience*, 1995. **67**(2): p. 409-18.
40. Harmar, A.J., et al., *Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse*. *Endocrinology*, 2004. **145**(3): p. 1203-10.
41. Hashimoto, H., et al., *Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. *Neuron*, 1993. **11**(2): p. 333-42.
42. Hosoya, M., et al., *Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **194**(1): p. 133-43.
43. Pozo, D., et al., *Functional characterization and mRNA expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) type I receptors in rat peritoneal macrophages*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1359**(3): p. 250-62.
44. Delgado, M., D. Pozo, and D. Ganea, *The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation*. *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(2): p. 249-90.
45. Gonzalez-Rey, E., P. Anderson, and M. Delgado, *Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy*. *Ann Rheum Dis*, 2007. **66 Suppl 3**: p. iii70-6.
46. Dickson, L. and K. Finlayson, *VPAC and PAC receptors: From ligands to function*. *Pharmacol Ther*, 2009. **121**(3): p. 294-316.
47. Lutz, E.M., et al., *The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide*. *FEBS Lett*, 1993. **334**(1): p. 3-8.
48. Guan, C.X., et al., *Intracellular signaling molecules involved in vasoactive intestinal peptide-mediated wound healing in human bronchial epithelial cells*. *Peptides*, 2007. **28**(9): p. 1667-73.
49. Guan, C.X., et al., *Role of CREB in vasoactive intestinal peptide-mediated wound healing in human bronchial epithelial cells*. *Regul Pept*, 2009. **153**(1-3): p. 64-9.
50. El Zein, N., B. Badran, and E. Sariban, *The neuropeptide pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates Ca²⁺ and pro-inflammatory functions in human monocytes through the G protein-coupled receptors VPAC-1 and formyl peptide receptor-like 1*. *Cell Calcium*, 2008. **43**(3): p. 270-84.
51. Hashimoto, H., et al., *Possible involvement of a cyclic AMP-dependent mechanism in PACAP-induced proliferation and ERK activation in astrocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **311**(2): p. 337-43.
52. Nakashima, M., K.J. Morrison, and P.M. Vanhoutte, *Hyperpolarization and relaxation of canine vascular smooth muscle to vasoactive intestinal polypeptide*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997. **30**(3): p. 273-7.
53. Aughton, K.L., et al., *Pharmacological profiling of neuropeptides on rabbit vaginal wall and vaginal artery smooth muscle in vitro*. *Br J Pharmacol*, 2008. **155**(2): p. 236-43.
54. Nicol, M.R., et al., *Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates cortisol secretion from the H295 human adrenocortical tumour cell line via VPAC1 receptors*. *J Mol Endocrinol*, 2004. **32**(3): p. 869-77.

55. Iwatsuki, K., L.M. Ren, and S. Chiba, *Effects of peptide histidine isoleucine on pancreatic exocrine secretion in anaesthetized dogs*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1993. **20**(7-8): p. 501-7.
56. Sanchez, V., R. Goberna, and J.R. Calvo, *Glycogenolytic effect of vasoactive intestinal peptide in the rat in vivo*. Experientia, 1991. **47**(6): p. 625-6.
57. Akesson, L., et al., *VPAC2-R mediates the lipolytic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide in primary rat adipocytes*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 744-50.
58. Umemoto, N., et al., *Serum levels of vasoactive intestinal peptide are elevated in patients with atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 2003. **31**(2): p. 161-4.
59. Zou, X. and X. Ruan, *[The alterations in vasoactive intestinal polypeptide-immune reaction positive neurons of cerebral tissues in epileptic rats induced by penicillin]*. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2000. **31**(3): p. 325-7.
60. Petkov, V., et al., *Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1339-46.
61. Koch, T.R., S.R. Michener, and V.L. Go, *Plasma vasoactive intestinal polypeptide concentration determination in patients with diarrhea*. Gastroenterology, 1991. **100**(1): p. 99-106.
62. Tsuto, T., et al., *Fine structure of neurons synthesizing vasoactive intestinal peptide in the human colon from patients with Hirschsprung's disease*. Histochemistry, 1989. **93**(1): p. 1-8.
63. Ollerenshaw, S., et al., *Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma*. N Engl J Med, 1989. **320**(19): p. 1244-8.
64. Adegate, E., et al., *Diabetes mellitus is associated with a decrease in vasoactive intestinal polypeptide content of gastrointestinal tract of rat*. Arch Physiol Biochem, 2001. **109**(3): p. 246-51.
65. Wu, Y.H., et al., *Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(8): p. 1239-47.
66. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, and M. Delgado, *Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 52-63.
67. Palermo, M.S., M.E. Vermeulen, and M.N. Giordano, *Human antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by interferon gamma-activated neutrophils is impaired by vasoactive intestinal peptide*. J Neuroimmunol, 1996. **69**(1-2): p. 123-8.
68. Kinhult, J., et al., *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide inhibits neutrophil chemotaxis*. Peptides, 2001. **22**(12): p. 2151-4.
69. Sergejeva, S., et al., *A synthetic VIP peptide analogue inhibits neutrophil recruitment in rat airways in vivo*. Regul Pept, 2004. **117**(2): p. 149-54.
70. Abdalla, E.E., *Modulation of human neutrophil apoptosis by gut hormones*. Int J Health Sci (Qassim), 2010. **4**(1): p. 53-8.
71. Maisnier-Patin, K., et al., *[mRNA-transfected dendritic cells: a promising strategy in immunotherapy]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(3): p. 279-84.
72. Alvarez, D., E.H. Vollmann, and U.H. von Andrian, *Mechanisms and consequences of dendritic cell migration*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 325-42.
73. Delgado, M., et al., *VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1122-30.
74. Delneste, Y., et al., *Vasoactive intestinal peptide synergizes with TNF-alpha in inducing human dendritic cell maturation*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3071-5.

75. Weng, Y., et al., *Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on the migration of mature dendritic cells*. J Neuroimmunol, 2007. **182**(1-2): p. 48-54.
76. Voice, J.K., et al., *Allergic diathesis in transgenic mice with constitutive T cell expression of inducible vasoactive intestinal peptide receptor*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2489-96.
77. Goetzl, E.J., et al., *Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13854-9.
78. Chorny, A., et al., *Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13562-7.
79. Delgado, M., E. Gonzalez-Rey, and D. Ganea, *The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7311-24.
80. Ganea, D. and M. Delgado, *Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. **13**(3): p. 229-37.
81. Ganea, D. and M. Delgado, *Inhibitory neuropeptide receptors on macrophages*. Microbes Infect, 2001. **3**(2): p. 141-7.
82. Delgado, M., et al., *VIP and PACAP differentially regulate the costimulatory activity of resting and activated macrophages through the modulation of B7.1 and B7.2 expression*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4213-23.
83. Delgado, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3629-35.
84. Martinez, C., et al., *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(5): p. 591-601.
85. De la Fuente, M., M. Delgado, and R.P. Gomariz, *VIP modulation of immune cell functions*. Adv Neuroimmunol, 1996. **6**(1): p. 75-91.
86. Delgado, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31427-36.
87. Delgado, M., et al., *VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFN-gamma synthesis by T cells*. J Neuroimmunol, 1999. **96**(2): p. 167-81.
88. Delgado, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1707-16.
89. Liew, F.Y., *T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 55-60.
90. Martinez, C., et al., *Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes*. J Neuroimmunol, 1999. **93**(1-2): p. 126-38.
91. Vassiliou, E., et al., *TH2 lymphocytes secrete functional VIP upon antigen stimulation*. Arch Physiol Biochem, 2001. **109**(4): p. 365-8.
92. Delgado, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide generates CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(6): p. 1327-38.

93. Gonzalez-Rey, E., et al., *Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(3): p. 864-76.
94. Fernandez-Martin, A., et al., *Vasoactive intestinal peptide induces regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(2): p. 318-26.
95. Deng, S., et al., *Regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis*. *Cell Immunol*, 2010. **265**(2): p. 105-10.
96. Moore, T.C., C.H. Spruck, and S.I. Said, *Depression of lymphocyte traffic in sheep by vasoactive intestinal peptide (VIP)*. *Immunology*, 1988. **64**(3): p. 475-8.
97. Moore, T.C., C.H. Spruck, and S.I. Said, *In vivo depression of lymphocyte traffic in sheep by VIP and HIV (AIDS)-related peptides*. *Immunopharmacology*, 1988. **16**(3): p. 181-9.
98. Burnett, D., *Immunoglobulins in the lung*. *Thorax*, 1986. **41**(5): p. 337-44.
99. Massacand, J.C., et al., *Intestinal bacteria condition dendritic cells to promote IgA production*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2588.
100. Walzer, T., et al., *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2252-8.
101. Rola-Pleszczynski, M., D. Bolduc, and S. St-Pierre, *The effects of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cell function*. *J Immunol*, 1985. **135**(4): p. 2569-73.
102. Peruzzi, M., et al., *Inhibition of natural killer cell cytotoxicity and interferon gamma production by the envelope protein of HIV and prevention by vasoactive intestinal peptide*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. **16**(11): p. 1067-73.
103. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. *Int Immunol*, 2009. **21**(4): p. 317-37.
104. Lotze, M.T., et al., *The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 60-81.
105. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(4): p. 279-89.
106. Klune, J.R., et al., *HMGB1: endogenous danger signaling*. *Mol Med*, 2008. **14**(7-8): p. 476-84.
107. Foell, D., et al., *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 28-37.
108. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. *Nature*, 2003. **425**(6957): p. 516-21.
109. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger, *Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells*. *Nat Med*, 1999. **5**(11): p. 1249-55.
110. Shi, Y. and K.L. Rock, *Cell death releases endogenous adjuvants that selectively enhance immune surveillance of particulate antigens*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(1): p. 155-62.
111. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. *Science*, 2010. **330**(6002): p. 362-6.
112. Akira, S. and S. Sato, *Toll-like receptors and their signaling mechanisms*. *Scand J Infect Dis*, 2003. **35**(9): p. 555-62.
113. Kanevets, U., et al., *A role of IgM antibodies in monosodium urate crystal formation and associated adjuvanticity*. *J Immunol*, 2009. **182**(4): p. 1912-8.
114. Shi, Y., *Caught red-handed: uric acid is an agent of inflammation*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(6): p. 1809-11.
115. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. *Nature*, 2006. **440**(7081): p. 237-41.

116. Arend, W.P., G. Palmer, and C. Gabay, *IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 20-38.
117. Iyori, M., et al., *A role of the Ca²⁺ binding site of DC-SIGN in the phagocytosis of E. coli*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(2): p. 367-72.
118. They, C., et al., *Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 599-610.
119. Denzer, K., et al., *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3365-74.
120. Pan, B.T., R. Blostein, and R.M. Johnstone, *Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach*. Biochem J, 1983. **210**(1): p. 37-47.
121. van Niel, G., et al., *Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles*. Gastroenterology, 2001. **121**(2): p. 337-49.
122. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
123. Blanchard, N., et al., *TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3235-41.
124. Keller, S., et al., *CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid*. Kidney Int, 2007. **72**(9): p. 1095-102.
125. Mincheva-Nilsson, L. and V. Baranov, *The role of placental exosomes in reproduction*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 520-33.
126. Zitvogel, L., et al., *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes*. Nat Med, 1998. **4**(5): p. 594-600.
127. Escola, J.M., et al., *Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20121-7.
128. Keller, S., et al., *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function*. Immunol Lett, 2006. **107**(2): p. 102-8.
129. Segura, E., S. Amigorena, and C. They, *Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 89-93.
130. Schorey, J.S. and S. Bhatnagar, *Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology*. Traffic, 2008. **9**(6): p. 871-81.
131. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. J Proteomics, 2010. **73**(10): p. 1907-20.
132. Camussi, G., et al., *Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication*. Kidney Int, 2010. **78**(9): p. 838-48.
133. Shen, C., et al., *Antileukaemia Immunity: Effect of Exosomes Against NB4 Acute Promyelocytic Leukaemia Cells*. J Int Med Res, 2011. **39**(3): p. 740-7.
134. Segura, E., et al., *ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming*. Blood, 2005. **106**(1): p. 216-23.
135. Utsugi-Kobukai, S., et al., *MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells*. Immunol Lett, 2003. **89**(2-3): p. 125-31.
136. Yang, X., et al., *Exosomes Derived from Immature Bone Marrow Dendritic Cells Induce Tolerogenicity of Intestinal Transplantation in Rats*. J Surg Res, 2010.
137. They, C., et al., *Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1156-62.

138. Raposo, G., et al., *Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation*. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(12): p. 2631-45.
139. Andreola, G., et al., *Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles*. *J Exp Med*, 2002. **195**(10): p. 1303-16.
140. Abusamra, A.J., et al., *Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**(2): p. 169-73.
141. Kim, S.H., et al., *Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive*. *Mol Ther*, 2006. **13**(2): p. 289-300.
142. Kim, J.W., et al., *Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(3): p. 1010-20.
143. Monleon, I., et al., *Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 6736-44.
144. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles*. *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1274-81.
145. Kissil, J.L., et al., *Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(46): p. 27932-6.
146. Miyazaki, T. and J.C. Reed, *A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(6): p. 493-500.
147. Griffith, T.S. and D.H. Lynch, *TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms*. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(5): p. 559-63.
148. Walczak, H. and P.H. Krammer, *The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 58-66.
149. Tosa, N., et al., *Critical function of death-associated protein 3 in T cell receptor-mediated apoptosis induction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **395**(3): p. 356-60.
150. Popa-Nita, O., et al., *Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(3): p. 763-73.
151. Thibault, S., et al., *TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 42.
152. Frasca, L., et al., *IFN-gamma arms human dendritic cells to perform multiple effector functions*. *J Immunol*, 2008. **180**(3): p. 1471-81.
153. Almeida, J., et al., *Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells*. *Clin Immunol*, 2001. **100**(3): p. 325-38.
154. Jensen, S.S. and M. Gad, *Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity*. *J Inflamm (Lond)*, 2010. **7**: p. 37.
155. Shoda, H., et al., *Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(6): p. R166.
156. Kodali, S., et al., *Vasoactive intestinal peptide modulates Langerhans cell immune function*. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 6082-8.
157. Ding, W., J.A. Wagner, and R.D. Granstein, *CGRP, PACAP, and VIP modulate Langerhans cell function by inhibiting NF-kappaB activation*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(10): p. 2357-67.

158. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 1992. **13**(1): p. 11-6.
159. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
160. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
161. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
162. Papadimitraki, E.D., G.K. Bertias, and D.T. Boumpas, *Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal*. J Autoimmun, 2007. **29**(4): p. 310-8.
163. Haas, B., et al., *Adenosine Reduces Cell Surface Expression of Toll-Like Receptor 4 and Inflammation in Response to Lipopolysaccharide and Matrix Products*. J Cardiovasc Transl Res, 2011.
164. Shi, Y., W. Zheng, and K.L. Rock, *Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14590-5.
165. Kobayashi, T., H. Kouzaki, and H. Kita, *Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6350-8.
166. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells*. Immunology, 1996. **89**(4): p. 511-7.
167. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2714-25.
168. Gandhi, R.T., et al., *HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1113-22.
169. Vasilescu, A., et al., *Genomic analysis of Fas and FasL genes and absence of correlation with disease progression in AIDS*. Immunogenetics, 2004. **56**(1): p. 56-60.
170. Herbeuval, J.P., et al., *CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3524-31.
171. Lum, J.J., et al., *Induction of cell death in human immunodeficiency virus-infected macrophages and resting memory CD4 T cells by TRAIL/Apo2l*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 11128-36.
172. Miura, Y., et al., *Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice*. J Exp Med, 2001. **193**(5): p. 651-60.
173. Yang, Y., et al., *Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6700-8.
174. Ryan, L.A., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates human neuronal apoptosis: links to HIV-1-associated dementia*. J Neuroimmunol, 2004. **148**(1-2): p. 127-39.
175. Herbeuval, J.P., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2458-64.
176. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
177. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, *DC-SIGN: escape mechanism for pathogens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 697-709.

178. Cobos-Jimenez, V., et al., *Macrophages and HIV-1*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2011. **6**(5): p. 385-90.
179. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 859-68.
180. Ignatius, R., et al., *The immunodeficiency virus coreceptor, Bonzo/STRL33/TYMSTR, is expressed by macaque and human skin- and blood-derived dendritic cells*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. **16**(11): p. 1055-9.
181. Jeong, E. and J.Y. Lee, *Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors*. *Yonsei Med J*, 2011. **52**(3): p. 379-92.
182. Ribeiro Dos Santos, P., et al., *Rapid Dissemination of SIV Follows Multisite Entry after Rectal Inoculation*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19493.
183. Lambert, A.A., et al., *DCIR-mediated enhancement of HIV-1 infection requires the ITIM-associated signal transduction pathway*. *Blood*, 2011.
184. Lambert, A.A., et al., *The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways*. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1299-307.
185. Curtis, B.M., S. Scharnowske, and A.J. Watson, *Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(17): p. 8356-60.
186. Kwon, D.S., et al., *DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection*. *Immunity*, 2002. **16**(1): p. 135-44.
187. Branch, D.R., et al., *VPAC1 is a cellular neuroendocrine receptor expressed on T cells that actively facilitates productive HIV-1 infection*. *AIDS*, 2002. **16**(3): p. 309-19.
188. Gozes, I. and D.E. Brenneman, *VIP: molecular biology and neurobiological function*. *Mol Neurobiol*, 1989. **3**(4): p. 201-36.
189. Shetzline, M.A., et al., *Vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor regulation. Desensitization, phosphorylation, and sequestration*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25519-26.
190. Gourlet, P., et al., *Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists*. *Peptides*, 1997. **18**(10): p. 1539-45.
191. Robberecht, P., et al., *Evidence that helodermin, a newly extracted peptide from Gila monster venom, is a member of the secretin/VIP/PHI family of peptides with an original pattern of biological properties*. *FEBS Lett*, 1984. **166**(2): p. 277-82.
192. Bokaei, P.B., et al., *HIV-1 integration is inhibited by stimulation of the VPAC2 neuroendocrine receptor*. *Virology*, 2007. **362**(1): p. 38-49.
193. Neurath, A.R., et al., *Search for epitope-specific antibody responses to the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoproteins signifying resistance to disease development*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1990. **6**(10): p. 1183-92.
194. Velikovic, V., et al., *Natural autoantibodies cross-react with a peptide derived from the second conserved region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **196**(3): p. 1019-24.
195. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 749-59.
196. Saidi, H., M.T. Melki, and M.L. Gougeon, *HMGB1-dependent triggering of HIV-1 replication and persistence in dendritic cells as a consequence of NK-DC cross-talk*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3601.

197. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 478-85.
198. Sharpstone, D., et al., *Small intestinal transit, absorption, and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea*. Gut, 1999. **45**(1): p. 70-6.
199. George, M.D., et al., *Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4+ T-cell restoration and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2709-19.
200. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
201. Nijhuis, L.E., B.J. Olivier, and W.J. de Jonge, *Neurogenic regulation of dendritic cells in the intestine*. Biochem Pharmacol, 2010.
202. Delgado, M. and D. Ganea, *VIP and PACAP inhibit activation induced apoptosis in T lymphocytes*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **921**: p. 55-67.

