

ALIONA BANCILA

**L'IMPACT DES EXOSOMES SUR LA VIABILITÉ
DES LYMPHOCYTES T CD4⁺ DANS LE CONTEXTE
DE L'INFECTION AU VIH-1**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures 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 D'IMMUNOLOGIE,
D'INFECTIOLOGIE ET DE MICROBIOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

Résumé

Les cellules dendritiques (CDs) sont connues comme étant les cellules sentinelles du système immunitaire. En effet, par leur capacité à capturer et à présenter les antigènes du soi ou étrangers, elles ont la propriété de moduler la réponse immunitaire innée et acquise. Toutefois, elles sont aussi connues pour libérer des vésicules dans le milieu extra cellulaire, dont entre autres les exosomes. Les exosomes sont des microvésicules de 30 – 100 nm jouant un rôle important au sein de l'intercommunication cellulaire. L'état d'activation des CDs influence drastiquement la composition et le rôle des exosomes. D'après des résultats préliminaires obtenus au sein du laboratoire, nous avons observé que les CDs ainsi que les lymphocytes T CD4⁺ (LTCD4) mis en contact avec le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) pouvaient libérer de plus grandes quantités d'exosomes. De plus, une préparation virale dépourvue en exosomes augmente la viabilité des LTCD4. Enfin, une analyse protéomique d'échantillons purifiés d'exosomes sur gradient d'optiprep a révélé un contenu enrichi en protéines jouant un rôle important dans la survie cellulaire : telle que, les protéines *Death-Associated-Protein 3* (DAP3) et *Apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF-1). Ces deux protéines sont connues pour participer à la voie d'activation des caspases entraînant l'apoptose. De ce fait, la présence de ces protéines dans les exosomes pourrait contribuer à l'élimination des LTCD4. En utilisant l'immunobuvardage nous avons mis en place le protocole et confirmé les résultats de l'analyse protéomique dans les cellules HEK-293T. Cependant, seulement la protéine DAP3 est détectée dans les exosomes isolés à partir de CDs mises en contact avec du virus atténué. De plus, il s'avère qu'une infection productive est nécessaire pour déceler la protéine. Finalement, en utilisant des ARN antisens anti-DAP3, nous avons favorisé la diminution de l'expression de la protéine DAP3. Ainsi, nous pouvons moduler l'expression de la protéine dans les CDs afin de vérifier éventuellement son impact sur la viabilité des LTCD4. En conclusion, tous les outils sont mis en place afin d'assurer la suite du projet qui pourrait nous permettre de mieux comprendre la déplétion des LTCD4 lors de la primo-infection.

Abstract

Dendritic cells (CDs) are known as sentinel cells of the immune system. Indeed, by their ability to capture and present self-antigens or foreign antigens, they have the ability to modulate innate and acquired immune system. However, they are also known to release vesicles into the extracellular environment, including exosomes. Exosomes are microvesicles of 30-100 nm, playing an important role in the cell intercommunication. The activation status of CDs drastically influences the composition and the role of exosomes. According to preliminary results obtained in the laboratory, we observed that the CDs and lymphocytes T CD4 + (LTCD4) brought into contact with the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) could release larger amounts of exosomes. In addition, a viral preparation lacking on exosomes increases the viability of LTCD4. Finally, a proteomic analysis was performed on samples of exosomes purified on optiprep gradient, revealing a content enriched in proteins that play an important role in cell survival, such as, Death-Associated Protein-3 (DAP3) and Apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf-1). These two proteins are known to participate in the process of activation of caspases. Thus, the presence of these proteins in exosomes may contribute to the elimination of LTCD4. Using immunoblot we have established the protocol and confirmed the results of proteomic analysis. Indeed, we observed the presence of Apaf-1 and DAP3 proteins in cells and exosomes from HEK-293T. However, only DAP3 protein is detected in exosomes isolated from CDs in contact with the attenuated virus. Moreover, it appears that productive infection is necessary to detect the protein. Finally, using RNA antisense anti-DAP3, we have decreased the expression of DAP3. Thus, we can modulate the expression of the protein in the CDs to see its impact on the viability of LTCD4. In conclusion, all tools are in place for the continuity of the project that could help us better understand LTCD4 depletion during primo-infection.

Avant-propos

Comme disait Mark Twain, « Il est noble de s'instruire, mais c'est encore plus noble d'instruire les autres ». Je remercie beaucoup le Dr Caroline Gilbert tout d'abord de m'avoir accueilli dans son laboratoire comme première étudiante à la maîtrise, mais surtout de m'avoir permis d'apprendre, de comprendre et de découvrir la science.

Je tiens à remercier tout particulièrement Sébastien Simard pour tout l'encadrement et le soutien tout au long de ma maîtrise, ainsi qu'Alexandra Lambert, qui m'a toujours supporté spécialement lors de mon écriture.

Un grand merci au Dr Sylvain Bourgoïn pour son aide et son soutien.

Merci à Sophie Proulx, Simon Mercier et Richard Chebbabi.

Un merci aux stagiaires Karianne St-Gelais, Geneviève Allaire et Gabrielle Beaulieu-Carbonneau, ainsi qu'à Isabelle Côté et Audrey Laroque.

Finalement, un merci à Rafik Menasria et Wilfried Moreira de m'avoir fait découvrir la science d'une manière différente.

*Je voudrais remercier ma sœur, Ludmila, et
ma mère, Zinovia, de toujours avoir cru en
moi. Puis, mes amis pour tout le support et
les encouragements tout au long de ma
maîtrise.*

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Avant-propos.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	xi
1. CHAPITRE I - Introduction	1
1.1 Les cellules dendritiques	1
1.1.1 Historique.....	1
1.1.2 Diversité.....	3
1.1.3 Les cellules dendritiques myéloïdes	7
1.1.4 Rôles des cellules dendritiques dans la primo-infection au VIH-1	10
1.2 Rôles des Lymphocytes T CD4 ⁺ dans la primo-infection au VIH-1.....	11
1.3 Les exosomes	12
1.3.1 Découverte	12
1.3.2 Biogénèse.....	13
1.3.3 Les différents types vésiculaires	17
1.3.3.1 Les microvésicules.....	18
1.3.3.2 Les ectosomes.....	19
1.3.3.3 Les vésicules apoptotiques.....	20
1.3.3.4 Les particules virales de VIH-1	21
1.3.4 Contenu protéique.....	21
1.3.5 Rôles des exosomes	24
1.3.5.1 Rôle dans la réponse immune	24
1.3.5.2 Thérapie anti-tumorale et vaccinale.....	25
1.3.5.3 Rôle anti-inflammatoire	26
1.3.5.4 Pathogenèse virale	27
1.3.5.5 La pathogenèse du VIH-1	29
1.4 L'apoptose	31
1.4.1 Les mécanismes de l'apoptose.....	31
1.4.2 Death-Associated Protein-3	33
1.4.3 Apoptotic peptidase activating factor 1	37
1.5 Hypothèse	40
2. CHAPITRE II – Matériel et Méthodes.....	43
2.1 Réactifs et Anticorps.....	43
2.1.1 Réactifs	43
2.1.2 Anticorps.....	43
2.2 Culture cellulaire.....	44
2.2.1 Les leucocytes mononucléés.....	44
2.2.2 Les CDs.....	44
2.2.3 Les lymphocytes T CD4 ⁺	45
2.2.4 Les cellules HEK-293T	45
2.3 Stimulation.....	45
2.3.1 Les cellules HEK-293T	45
2.3.2 Les CDs et les leucocytes mononucléés	46

2.4 Transfection des PBMCs et des CDs avec des ARN antisens anti-DAP3.....	46
2.5 Isolement des exosomes.....	46
2.6 Prolifération	47
2.7 Immunobuvardage	47
3. CHAPITRE III - Résultats.....	49
3.1 Présence des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les différents types cellulaires utilisés pour la production de virus	49
3.2 Les cellules HEK-293T	50
3.3 Les LTCD4	53
3.4 Les PBMCs et les CDs stimulées par les cristaux d'UMS	56
3.5 Les CDs stimulées avec du virus atténué VIH-1	58
3.6 Transfection des CDs avec des ARN anti-sens anti-DAP3	61
4. CHAPITRE IV - Discussion.....	63
4.1 Présence de molécules proapoptotiques dans les exosomes	63
4.2 La protéine Apaf-1 dans les cellules et les exosomes.....	64
4.3 La protéine DAP3 dans les cellules et les exosomes	65
4.4 La protéine DAP3 dans les exosomes des CDs stimulées avec le VIH-1 atténué....	68
4.5 Diminution de l'expression de la protéine DAP3	69
5. CHAPITRE V – Conclusion et perspective.....	70
6. BIBLIOGRAPHIE.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution et caractéristiques des différentes populations de cellules dendritiques.....	6
Tableau 2 : Caractéristiques de chaque sous type de vésicules secrétées.....	18

Liste des figures

Figure 1: Photo de microscopie en contraste de phase de cellules dendritiques	2
Figure 2: Origine des cellules dendritiques hématopoïétiques et mésenchymateuses.....	5
Figure 3: Schéma de maturation de la cellule dendritique.....	9
Figure 4: Le rôle de la machinerie ESCRT dans la biogenèse des exosomes..	14
Figure 5: Représentation schématique de la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire.....	16
Figure 6: Rôles de Rab27 dans le trafic vésiculaire.....	17
Figure 7: Mécanismes de libération des ectosomes et des exosomes.....	20
Figure 8: Distribution du contenu protéique des exosomes.....	23
Figure 9: Transmission du VIH-1 par le modèle en <i>trans</i> exploitant les propriétés des exosomes à être internalisés par les CD _s matures.	30
Figure 10: Schéma général de l'apoptose: voie intrinsèque et extrinsèque.....	32
Figure 11: Structure de la protéine DAP3..	34
Figure 12: Induction de l'apoptose par l'activation de TRAIL...	36
Figure 13: Structure de la protéine Apaf-1	37

Figure 14: Formation de l'apoptosome.....	39
Figure 15: Production d'exosomes par les cellules dendritiques stimulées avec le VIH-1.	42
Figure 16: Expression des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les HEK-293T, les LTCD4, les PBMCs et les CDs	50
Figure 17: Expression des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les cellules et présence dans les exosomes de cellules HEK-293T naïves..	52
Figure 18: Détection de la protéine DAP3 dans les cellules et dans les exosomes de cellules HEK-293T stimulées...	53
Figure 19: Détection de la protéine DAP3 et Apaf-1 dans les cellules et les exosomes des lymphocytes T CD4 ⁺	55
Figure 20: Détection de la protéine DAP3 dans les PBMCs stimulées avec les cristaux d'UMS	56
Figure 21: Détection de la protéine DAP3 dans les cellules et les exosomes des CDs stimulées aux cristaux d'UMS.....	57
Figure 22: Test de prolifération sur les LTCD4 avec des échantillons d'exosomes ou des CDs mises en contact avec du VIH-1 atténué.....	60
Figure 23: Expression de DAP3 dans les CDs transfectées avec un ARN antisens anti-DAP3 à 5h et 24h et la densitométrie correspondant au ratio de DAP3/actine... ..	62

ABRÉVIATIONS

A23187 :	Ionophore de calcium
AA :	Acide aminé
AChE :	Acétylcholine estérase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AIF :	<i>Apoptosis inducing factor</i>
Ag :	Antigène
APOBEC3G :	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G</i>
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
CARD :	<i>Domain N-terminal CED-3-like</i>
CASPASE :	<i>Cysteine-dependent aspartate-cleaving proteases</i>
CCR7 :	<i>C-C chemokine receptor type 7</i> , Récepteur de chimiokine C-C de type 7
CDs :	Cellules dendritiques
CDFs :	Cellules dendritiques folliculaires
CG :	Centre Germinatif
CMH-I/II :	Complexe majeur d'histocompatibilité I/II
CMV :	Cytomégalovirus
CPA :	Cellules présentatrices d'antigènes
CR1 :	Récepteur du complément 1
CTL :	Cellule T CD8 ⁺ cytotoxique
DAP3 :	<i>Death-Associated-Protein 3</i>
DCIR :	<i>Dendritic cell-associated C-type lectin-like receptor</i> , Récepteur lectine de type C associée aux cellules dendritiques
DC-SIGN :	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DELE :	<i>Death ligand signal enhancer</i>
DMEM :	<i>Dulbecco modified Eagle medium</i>
DR :	<i>Death receptor</i> , Récepteur de mort
EBV :	Epstein-barr virus
EGF :	<i>Epidermal growth factor</i> , Facteur de croissance épidermique
ESCRT :	<i>Endosomal sorting complexe required for transport</i> , Complexe de tri cellulaire requis pour le transport
FADD :	<i>Fas-associated death domain protein</i>
gB/M :	Glycoprotéines B/M
GALT :	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> , Tissus lymphoïdes de l'intestin
GM-CSF :	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
GTP :	Guanosine triphosphate

H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HBSS :	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HLA :	<i>Human leucocyte antigene</i> , Antigène humain de leucocyte
HHV-1 :	<i>Herpes simplex virus 1</i> , Virus de l'herpès simplex 1
HHV-6 :	<i>Humain Herpes virus 6</i> , Virus de l'herpès humain 6
HSP:	<i>Heat shock protein</i> , Protéine de choc thermique
ICAM-1 :	Molécule d'adhésion intercellulaire 1
IL :	Interleukine
INF:	Interferon
kDa :	Kilodalton
LB:	Lymphocytes B
LBPA :	Acides lysobisphosphatidiques
LMP1 :	<i>Latent membrane protein-1</i> , Protéine de latence membranaire 1
LPS :	Lipopolysaccharide
LT :	Lymphocytes T
LTC8 :	Lymphocytes T CD8 ⁺
LTC4 :	Lymphocytes T CD4 ⁺
MRP29 :	<i>Mitochondrial ribosomal protein S29</i> , Protéine mitochondriale et ribosomale S29
MTT:	<i>Thiazol Bromide</i> , Bromure de thiazol
MVB :	<i>Multivesicular bodies</i> , Les corps multivésiculaires
PBL:	<i>Peripheral blood lymphocytes</i>
PBS:	<i>Phosphate buffered solution</i>
PBMCs :	Leucocytes mononucléés
pCDs :	Cellules dendritiques plasmocytoides
PHA-L :	Phytohémagglutinine-L
PVDF :	Membranes de polyvinylidènefluorure
SB :	<i>Sample buffer</i> , Tampon d'échantillon
SIDA :	Syndrôme de l'immunodéficience humaine acquise
TBS :	<i>Tris buffer saline</i>
TCR :	<i>T cell receptor</i> , Récepteur cellulaire T
Tim1/4 :	<i>T-cell immunoglobulin and mucin protein-1/4</i> ,
TLR:	<i>Toll like receptor</i>
TNF:	Facteur de nécrose tumorale
TP :	Température de la pièce
TRAIL:	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UMS :	urate monosodique
UTR :	<i>Untranslated region</i> , Région non-traduite
VHC :	Virus de l'hépatite C
VIH-1 :	Virus de l'immunodéficience humaine

CHAPITRE I : Introduction

1.1. Les cellules dendritiques

1.1.1. Historique

C'est en 1868, que Paul Langerhans, jeune étudiant en médecine, décrit les toutes premières cellules dendritiques (CDs) (1). Au départ, il les a identifiées comme étant des récepteurs intra épidermiques du système nerveux. Cependant, en 1882, il se rendit compte que ces cellules n'étaient nullement des cellules faisant partie du système nerveux (1). Ce n'est qu'en 1973 que Steinman et Cohn ont pu les observer par microscopie en contraste de phase, tel qu'illustré à la figure 1 (2). Depuis, les CDs suscitent l'intérêt de nombreux chercheurs. Elles ont été la source de plusieurs découvertes, entre autre, les différentes sous populations de CDs ainsi que leur rôle clé dans la présentation antigénique ou la réponse innée (3-6). En effet, leurs capacités à induire et réguler la réponse immunitaire innée et acquise font d'elles les cellules les plus étudiées dans le domaine de l'immunologie et de la recherche clinique (7-8).

Les CDs se distinguent par leur morphologie particulière et leur capacité à former des pseudopodes ou encore des prolongations cytoplasmiques, de longueurs et de formes variables à la suite d'une activation. La figure 1 illustre bien les différentes morphologies et ramifications de ces cellules. Ces prolongements, qui ressemblent à des dendrites, leur ont valu le nom de cellules dendritiques (2). Enfin, le noyau de ces cellules est de forme irrégulière et large, et a des propriétés réfringentes.

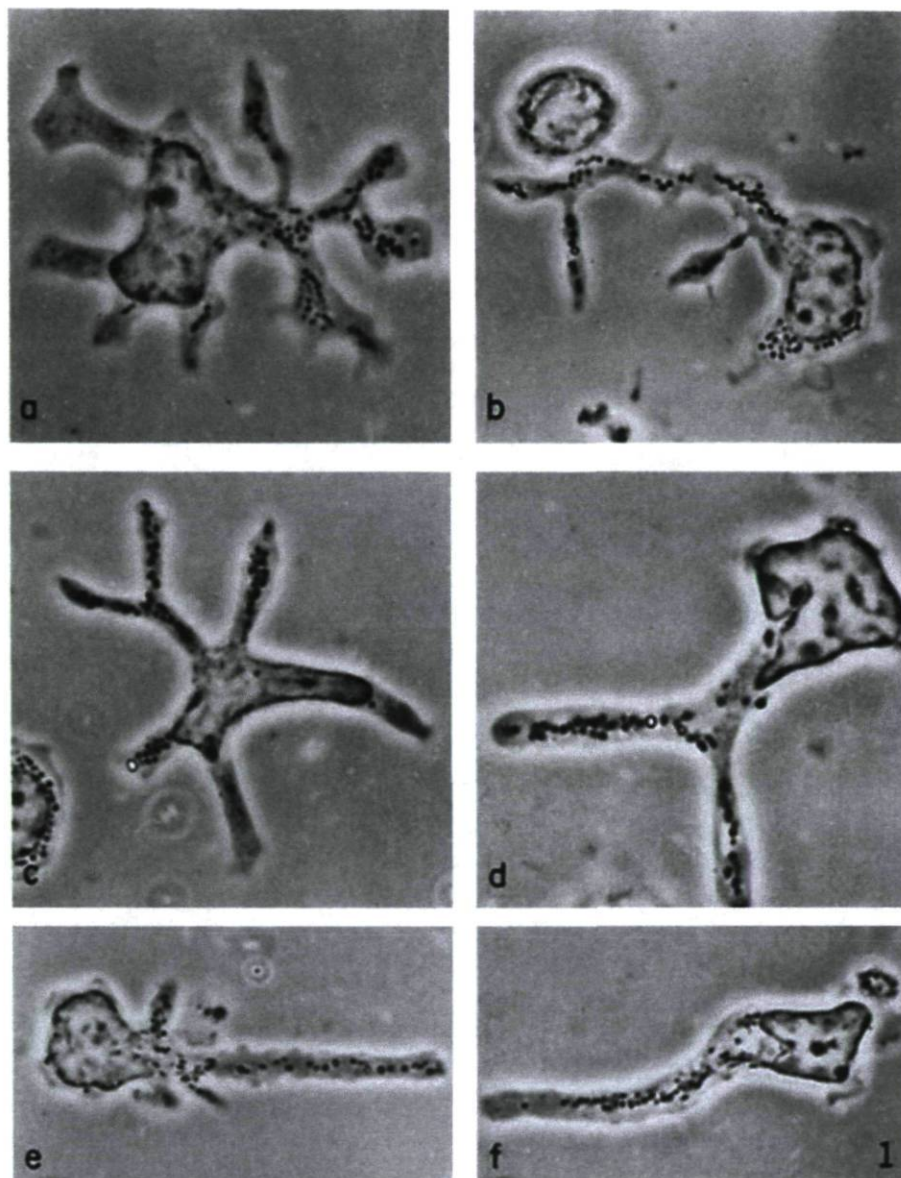


Figure 1 : Photo de microscopie en contraste de phase de cellules dendritiques isolées à partir (a) – (d) de la rate, (e) des organes lymphoïdes, (f) des plaques de Peyer. D’après Steinman, R. M., et Z. A. Cohn. 1973 (2).

1.1.2. Diversité

Aujourd'hui, on compte plusieurs sous populations de CD. Elles sont répertoriées en fonction de leur origine, leur localisation, leur fonction et des récepteurs membranaires qu'elles expriment. Les CD dérivent des cellules mésenchymateuses ou hématopoïétiques. La figure 2 et le tableau 1 présentent les différentes caractéristiques des CD.

Les cellules dendritiques folliculaires (CDFs) dérivent des cellules mésenchymateuses. Elles résident dans les centres germinatifs (CGs) et se développent principalement sous l'action du TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (9). Les CGs sont aussi le lieu de prolifération des lymphocytes B (LB), cellules responsables d'une partie de la réponse humorale. Les CDFs présentent les antigènes, sous forme de complexe-immun (antigène-anticorps complément) aux LB (10-11). En effet, les CDFs se différencient des autres CD par le fait qu'elles n'internalisent pas l'antigène (Ag) et le maintiennent à leur surface sous forme de complexe immun. Pour se faire, les CDFs expriment à leur surface des récepteurs Fc et des récepteurs du complément (10). La présentation antigénique du complexe-immun provoque la sélection des LB mémoires (7). Seuls les LB ayant une forte affinité pour l'antigène survivront, contrairement aux autres cellules qui vont être éliminées par apoptose ou par nécrose.

Les CD d'origine hématopoïétique peuvent prendre la voie myéloïde ou lymphoïde. Les progéniteurs lymphoïdes $CD34^+$ donnent des précurseurs $CD11c^-$ qui se différencient en CD plasmocytoïdes (pCDs) immatures en présence d'Interleukine-3 (IL-3) et du CD40L (12). Ce type cellulaire se retrouve dans le sang (13-14), le thymus (15-16), ainsi que dans les zones T des organes lymphoïdes (13, 17). Les pCDs sont peu efficaces pour la présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs. Elles participent au contrôle de l'infection virale par leur capacité à produire de l'*Interféron α/β* (INF- α/β) (18-19). Les pCDs participent aussi à la régulation de la réponse inflammatoire (20), au développement des maladies auto-immunes (17), ou de cancers (21).

Les CD34⁺ dites d'origine myéloïde donnent naissance à deux types de cellules précurseurs CD11c⁺. Les CD1⁺ CD14⁻ et les CD1⁻ CD14⁺ respectivement connues sous le nom de cellules de Langerhans et de CD^s interstitielles. Ces deux types cellulaires nécessitent du GM-CSF et de l'IL-4 pour se différencier en CD^s immatures (22). Les cellules de Langerhans résident principalement sous la peau tandis que les CD^s interstitielles se retrouvent dans les muqueuses. Ces deux types cellulaires sous leurs états immatures sont présents dans les tissus périphériques et sont spécialisés dans la capture de l'Ag (endocytose, phagocytose). À la suite de la capture des Ag, elles se domicilient dans les ganglions lymphatiques où elles deviennent des cellules matures capables de présenter les Ag aux Lymphocytes T (LT) naïfs (23-24). Dans le contexte d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les CD^s interstitielles sont aussi connues pour jouer un rôle important dans la pathogenèse, elles seront décrites plus loin en détail (25-27).

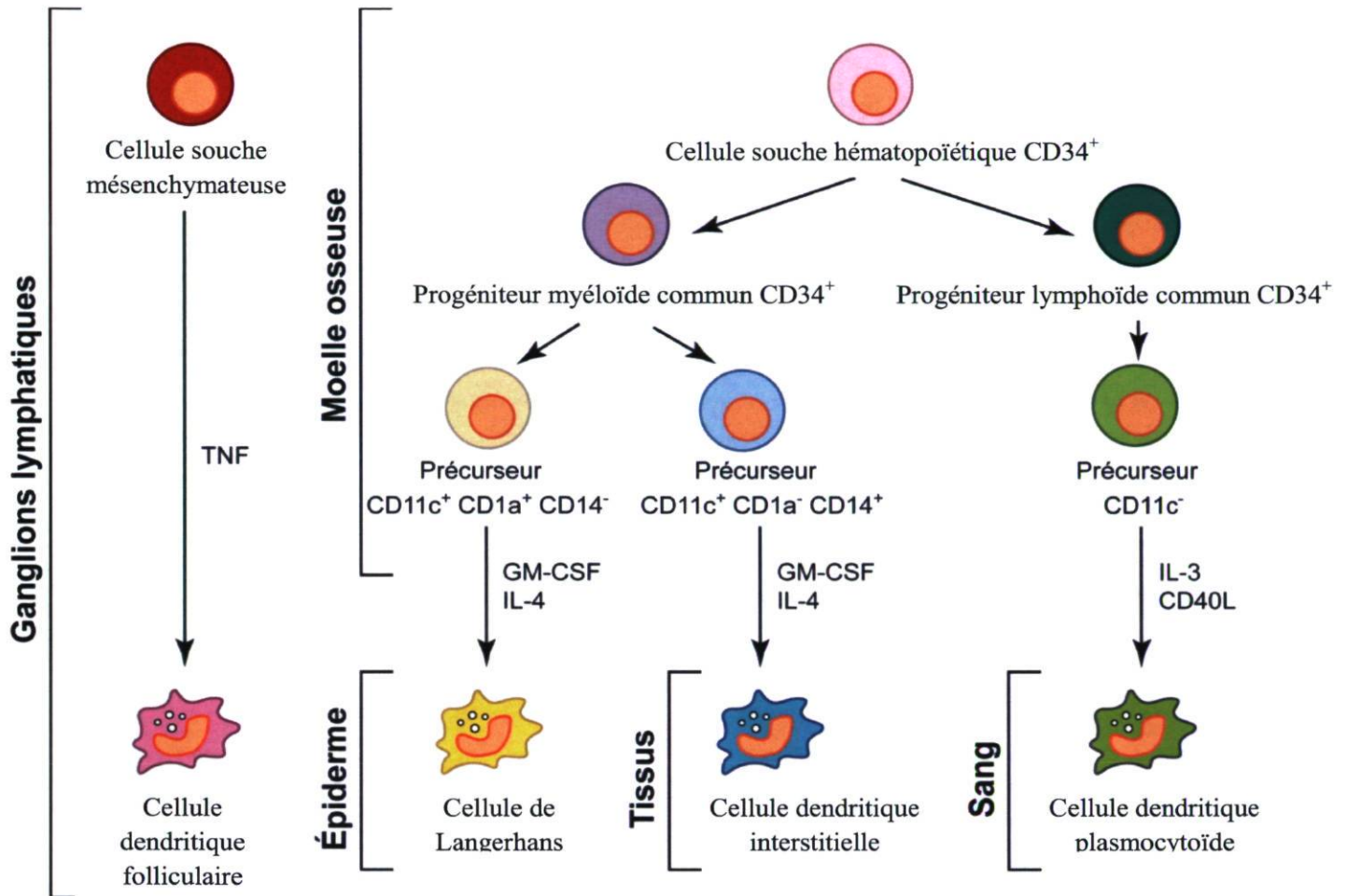


Figure 2 : Origine des cellules dendritiques hématopoïétiques et mésenchymateuses.
Modifié d'après Maisnier-Patin et al., 2007, *Med Sci* (28)

	Localisation	Fonctions	Marqueurs de surfaces	Récepteurs de Chimiokines	TLR
CDs myéloïdes	Muqueuses, Tissus périphériques, Épithélium, la peau, ganglions lymphatiques	Capture de l'Ag, présentation antigénique, élimination bactérienne, activation du système immunitaire	CD11c ⁺ , CD14, CD1 CD13, CD45RA, CD4, CD68, CD40, CD83	CCR2, -5, -6, -7, CXCR4	TLR 1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8
CDs plasmocytoïdes	Sang, thymus, zones T des organes lymphoïdes	Présentation antigénique, Régulation de l'inflammation, des maladies auto-immunes, des tumeurs	CD11c ⁻ , IL-3R, CD45RO, CD80, CD86, CD40, CD62L	CCR2, -5, -7, CXCR4, CXCR3	TLR7, -9
Cellules dendritiques folliculaires	Centres Germinatifs des follicules lymphoïdes	Présentation antigénique aux LB dans les centres germinatifs (pas d'internalisation de l'Ag)	CD35, CD21, CD106	CXCR5, CXCR7	TLR4

Tableau 1 : Distribution et caractéristiques des différentes populations de cellules dendritiques.

1.1.3. Les cellules dendritiques myéloïdes

Les CD_s se présentent d'abord sous un stade immature et deviennent matures sous l'action de différentes molécules telles que le lipopolysaccharide (LPS) et l'IFN- γ . Sous leur forme immatures, les CD_s sont dotées d'une forte capacité à endocyter les Ag ou à phagocyter les pathogènes: première étape vers le développement d'une réponse immunitaire spécifique. La seconde étape est réalisée lorsque les CD_s matures présentent l'Ag aux LT naïfs. En plus de participer à la reconnaissance des pathogènes incluant le VIH-1, elles participent activement à l'homéostasie de la réponse immune en induisant la tolérance.

La tolérance immunitaire est l'absence de réponse immunitaire à un Ag du soi (24). Elle est acquise lors d'un premier contact avec l'Ag. L'absence de réponse immunitaire à l'Ag du soi est nécessaire à l'homéostasie de la réponse immunitaire empêchant le développement des maladies auto-immunes (24). Les CD_s jouent un rôle dans l'induction de la tolérance centrale et périphérique. La tolérance centrale a lieu dans le thymus, alors que la tolérance périphérique a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans les deux cas, les CD_s effectuent la présentation antigénique des peptides du soi par les complexes majeurs d'histocompatibilités I/II (CMH-I/II). Dans le premier cas, la présentation antigénique permet la sélection des thymocytes doublement positifs ($CD4^+/CD8^+$). Les thymocytes qui développent une haute affinité pour l'Ag vont être éliminés, c'est la sélection négative (29). À l'opposé, les thymocytes sélectionnés positivement vont survivre et perdre l'une des deux molécules pour acquérir des fonctions spécifiques. Dans le deuxième cas, la présentation antigénique permet l'élimination des LT matures auto réactifs en les éliminant du système immunitaire ou en provoquant une anergie (23-24, 30). La présentation antigénique dans l'induction de la tolérance dépend de plusieurs facteurs. Le contact entre le CMH-peptide, le récepteur des LT ou encore le TCR ainsi que des signaux de costimulations (CD40/CD40L) et des facteurs présents dans le milieu (IL-1,-6,-12,-23,-10, TGF- β) (31-32).

Avant d'être présenté, la reconnaissance et la capture de l'Ag passe par les CD_s immatures situées dans les tissus périphériques. L'efficacité des CD_s à capturer l'antigène fait intervenir la macropinocytose, la phagocytose et l'internalisation induit par des récepteurs de surface tels que les récepteurs lectine de type C (DC-SIGN, DCIR), les récepteurs Fc γ et les TLR (*Toll like receptor*). L'Ag internalisé dans les compartiments endosomaux sera clivé sous forme de peptides de 13 à 18 acides aminés, qui se retrouveront en présence du CMH-II situé dans l'endosome tardif. Le peptide déplacera la molécule CLIP et sera chargé sur le CMH-II. L'ensemble CMH-II-peptide migrera jusqu'à la membrane plasmique pour la présentation antigénique. Toutefois, il existe une deuxième voie de présentation des peptides exogènes impliquant les CMH-I. En effet, les CD_s sont aussi les seules CPA capables d'effectuer la présentation des Ag exogènes via le CMH-I appelé la présentation croisée. Ce phénomène est essentiel à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (LTCD8). Simultanément, des stimuli pro-inflammatoires régulent à la baisse la sensibilité de CD_s immatures à capturer l'Ag et adoptent le phénotype mature (33-35). La figure 3 représente les différents stades de maturation des CD_s et leurs récepteurs.

L'activation des CD_s immatures entraîne des changements morphologiques, comme la perte des complexes d'adhésions, une réorganisation du cytosquelette et l'augmentation de l'expression du récepteur de chimiokine C-C de type 7 (CCR7) (36). L'augmentation du CCR7 favorise la domiciliation des CD_s aux ganglions lymphatiques (tractus gastro-intestinal, rate) afin de présenter l'Ag aux lymphocytes T CD4⁺ (LTCD4) naïfs. Enfin, les propriétés migratoires des CD_s font d'elles des cellules de choix pour certains pathogènes, tel que le VIH-1, qui les utilise pour se cacher du système immunitaire pour être transféré et infecter efficacement les LTCD4.

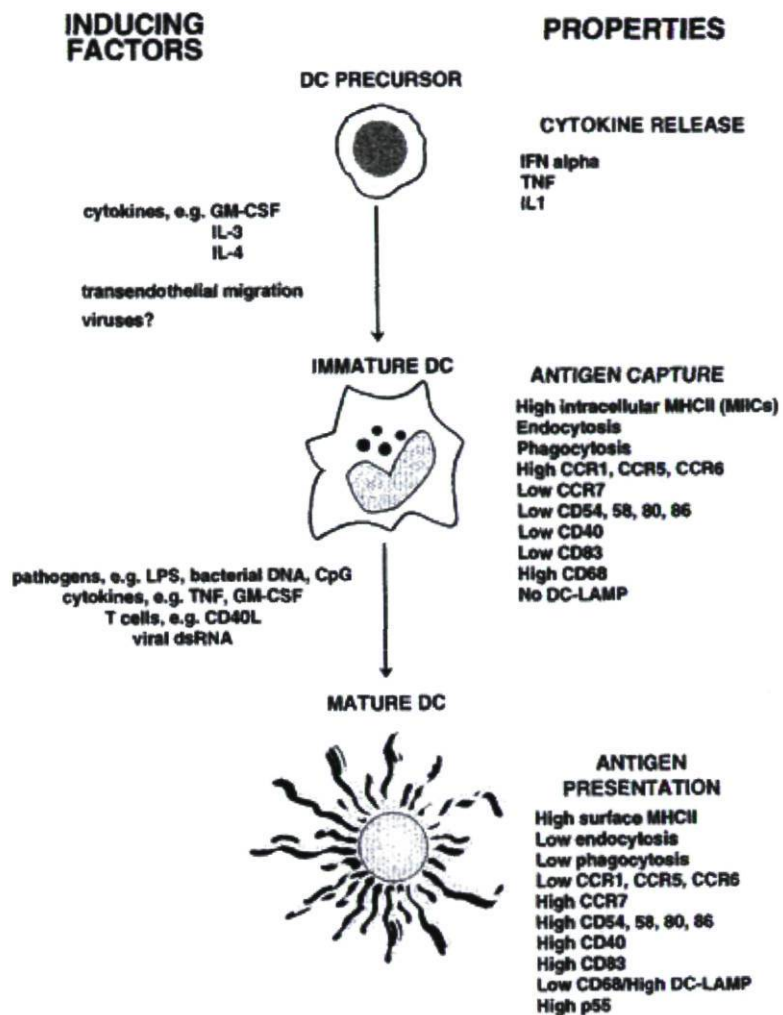


Figure 3 : Schéma de maturation de la cellule dendritique.
 D'après Banchereau et al., 2000, *Immunol.* (37)

1.1.4. Rôle des CD4 dans la primo-infection au VIH-1

L'infection au VIH-1 comporte trois phases: la phase de la primo-infection, la phase de latence et la phase chronique. La primo-infection s'étend sur quelques mois, le virus pénètre dans l'organisme et commence à infecter progressivement les cellules du système immunitaire. Une forte réplication virale entraînant une diminution considérable des LTCD4 du tractus gastro-intestinal est observée (38-41). Cette phase est généralement asymptomatique ou avec des symptômes non spécifiques ressemblant à une mononucléose ou à une grippe (42-43). La deuxième phase, la période de latence est l'atteinte d'un équilibre entre la réplication du virus et son élimination par le système immunitaire (44). Elle est asymptomatique et peut durer plusieurs années. Toutefois, la progression de l'infection continue. L'équilibre est interrompu tout d'abord à cause de la déplétion progressive des LTCD4 (45-46), puis, parce que le virus arrive à échapper au système immunitaire entraînant l'augmentation de la virémie et l'écroulement du système immunitaire (47-48). La déclaration de la maladie du SIDA est la troisième et dernière phase. Elle est caractérisée par l'apparition de maladies opportunistes et la déplétion quasi totale des LTCD4 (49).

Le virus peut entrer dans l'organisme de plusieurs manières. Il peut entrer à la suite d'une lésion de l'épithélium, par transcytose, ou suite à la liaison aux récepteurs de surface CCR5 de la barrière des cellules épithéliales (50-53). Le VIH-1 peut aussi se lier directement aux LTCD4 présents dans l'épithélium (54). Les CD4 immatures sont aussi des cibles de choix pour le virus. En effet, ce sont les premières cellules présentes sous la barrière muqueuse capables de capturer le virus s'y trouvant déjà et capables de l'attraper à l'extérieur de la barrière à l'aide de leurs dendrites (55).

L'efficacité de la transmission du VIH-1 passe donc par les CD4 (25). La transmission du virus d'une cellule infectée comme une CD4 à une cellule non infectée comme un LTCD4 peut se faire suivant deux modes distincts. La transmission dit en *cis* nécessite une infection productive des CD4 (56). Le virus se lie à son récepteur CD4 et son corécepteur CCR5 présents à la surface des CD4. Il est intéressant de noter que le récepteur lectine de type C,

DCIR, joue un rôle dans le processus de l'infection (57). L'ADN proviral migre jusqu'au noyau et s'intègre au génome de la cellule (27). S'ensuit la réplication du virus, l'assemblage, puis le bourgeonnement dans les endosomes tardifs. Il s'agit d'un processus long avec la synthèse de nouvelles particules virales.

Le mode de transmission en *trans* fait aussi intervenir les récepteurs lectine de type C dont, entre autres, DC-SIGN et DCIR (57-58). Le VIH-1 se retrouve internalisé entièrement avec son récepteur dans les endosomes tardifs. Une portion du virus internalisé dans les endosomes échappe à la dégradation et reste infectieux jusqu'à sa libération (58-59). En effet, l'endosome tardif est connu pour fusionner avec la membrane plasmique de la cellule, libérant son contenu dans le milieu extra cellulaire. Le virus dissimulé dans les endosomes tardifs migrera incognito dans les organes lymphoïdes secondaires où il sera transféré aux LTCD4 (27, 51, 58).

1.2. Rôles des lymphocytes T CD4⁺ dans la primo-infection au VIH-1

Il est maintenant reconnu que les premiers dommages de l'infection au VIH-1 se situent dans les organes lymphoïdes, dont le tractus gastro-intestinal, sites majeurs de la réplication virale (60). Effectivement, seulement 15 jours après l'infection une déplétion quasi totale des LTCD4 est observée, entraînant des conséquences irréversibles sur le système immunitaire à court comme à long terme (61). Plusieurs facteurs contribuent à cette immunodéplétion : i) la toxicité liée directement à l'infection des LTCD4 (61), ii) la mort des LTCD4 infectés par l'action cytotoxique des LTCD8 (62), iii) l'augmentation de l'entrée en apoptose des cellules infectées comme des cellules avoisinantes non infectées (63).

Par conséquent, la déplétion des LTCD4 cause une perte de la mémoire immunologique (61). Le système immunitaire se reconstruit mais un état d'hyper activation persiste. De plus, l'absence de LTCD4 durant la primo-infection affecte considérablement le développement d'une réponse immunitaire protectrice (61, 64-65). En effet, les LTCD4

auxiliaires jouent un rôle important dans le développement, la maturation ainsi que la maintenance des LT cytotoxiques (66). Le contrôle de l'activité bactéricide des macrophages et le développement de la réponse humorale entraînant la production d'anticorps par les LB passent par l'action des LTCD4 (67-68). L'activation des LTCD4 passe par les CDs ayant capturé le virion à la surface des muqueuses qui migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques. Les CDs vont alors présenter les Ag viraux par le biais du CMH-II (69-70) et transférer le virus internalisé dans les endosomes tardifs (58-59) ou les particules virales nouvellement synthétisées aux LTCD4 (27, 71). La transmission du virus entraîne la déplétion massive des LTCD4 mémoires infectés et non-infectés, dans le tractus digestif du GALT (61). Toutefois, l'infection virale seule ne peut expliquer en totalité cette déplétion (72). D'autres facteurs pourraient être impliqués. Parmi ces facteurs, les exosomes qui se trouvent avec le virus dans les endosomes tardifs des CDs pourraient être libérés par les CDs lors du transfert du virus contribuant aussi l'immunodéplétion (73).

1.3. Les exosomes

1.3.1. Découverte

Les exosomes sont des microvésicules d'origine endosomale de forme sphérique de 30-100 nm. Ces vésicules libérées dans le milieu extracellulaire par les cellules épithéliales et hématopoïétiques jouent un rôle dans l'intercommunication cellulaire. La présence d'exosomes dans le milieu extracellulaire a été mise en évidence en 1984 lors d'études réalisées sur le récepteur de la transferrine (74). Pan et Johnston ont découvert que le récepteur était complètement perdu lors de la sécrétion de vésicules au stade final de maturation des érythrocytes. En premier lieu, on pensait que les exosomes étaient des vésicules dérivées du bourgeonnement de la membrane plasmique (75). Cependant, en suivant la maturation des érythrocytes en microscopie électronique une endocytose suivie d'un bourgeonnement de l'endosome avec la membrane plasmique du récepteur couplé à un anticorps polyclonal, dans le compartiment interne de l'endosome multivésiculaire a été observée (76).

1.3.2. Biogenèse

La biogenèse des exosomes a lieu dans les endosomes multivésiculaires à la suite de l'invagination de la membrane vers l'intérieur du compartiment. Les endosomes multivésiculaires sont le carrefour de tri cellulaire. L'essentiel des protéines et des lipides destinés à la dégradation ou à la libération dans le milieu extérieur sont stockés dans les endosomes multivésiculaires jusqu'à leur fusion avec le lysosome ou la membrane plasmique cellulaire (77). Le recrutement des protéines, des lipides et des récepteurs vers l'endosome multivésiculaire peut être dépendant ou non de la machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) (78).

La machinerie ESCRT est composée de quatre complexes protéiques (ESCRT-0, -I, -II, -III) et de facteurs tels que la protéine Alix et d'une ATPase VSP4. Le complexe ESCRT-0 et ESCRT-I est essentiel à la reconnaissance et au recrutement des protéines mono ubiquitinylées aux endosomes (78). S'en suit le remodelage de la membrane des endosomes via les interactions protéine-protéine et protéine-lipide favorisant l'invagination de la membrane par les complexes ESCRT-II et ESCRT-III et les facteurs Alix et VSP4 (figure 4) (79-80). Finalement, c'est le complexe ESCRT-III qui est responsable du détachement des vésicules s'accumulant dans la lumière endosomale (81).

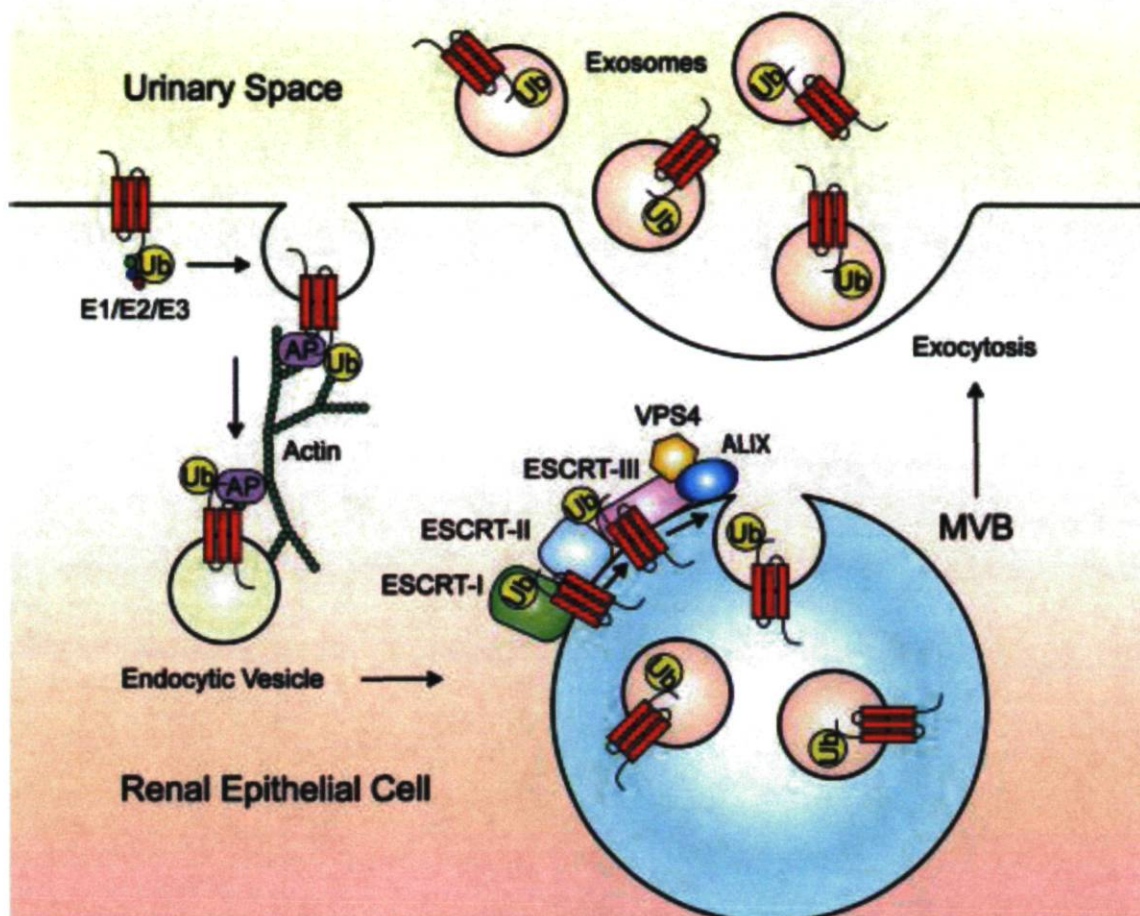


Figure 4 : Le rôle de la machinerie ESCRT dans la biogenèse des exosomes. D'après Pisitkun et al., 2004, *PNAS*. (79)

Toutefois, la biogenèse des exosomes fait aussi intervenir des molécules indépendantes de la voie ESCRT comme les acides lysobisphosphatidiques (LBPA) (82-83), les céramides (84) ou les protéines annexines (85). Les LBPA sont très abondants dans la membrane de l'endosome. De plus, Matsuo et al. ont observé qu'en milieu acide la concentration de LBPA est augmentée induisant le bourgeonnement spontané de la membrane endosomale (82). Le bourgeonnement de la membrane conduit à la formation des exosomes (83).

La céramide, un lipide de la famille des sphingomyélines, est responsable de l'agrégation lipidique à la surface de la membrane de l'endosome. Ce phénomène forme les

microdomaines ou encore les radeaux lipidiques favorisant le bourgeonnement des exosomes (84).

Une autre voie ESCRT-indépendante est celle de l'annexine-1. En effet, l'accumulation des récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGF), après stimulation, passe par la voie de l'annexine-1 (85). Les mécanismes exacts ne sont pas connus. Cependant, sans l'annexine-1, l'accumulation du récepteur de l'EGF est très fortement atténuée.

Après avoir bourgeonné, les vésicules s'accumulent dans la lumière endosomale jusqu'à ce que l'ensemble du compartiment fusionne avec la membrane plasmique, sécrétant alors les exosomes dans le milieu extracellulaire (Figure 5) (86-88). Il est intéressant de noter que le pH dans l'exosome reste le même que celui du cytoplasme, c'est-à-dire $\text{pH}=7,5$, contrairement à celui du MVB qui est plus acide ($\text{pH}=5$) (82).

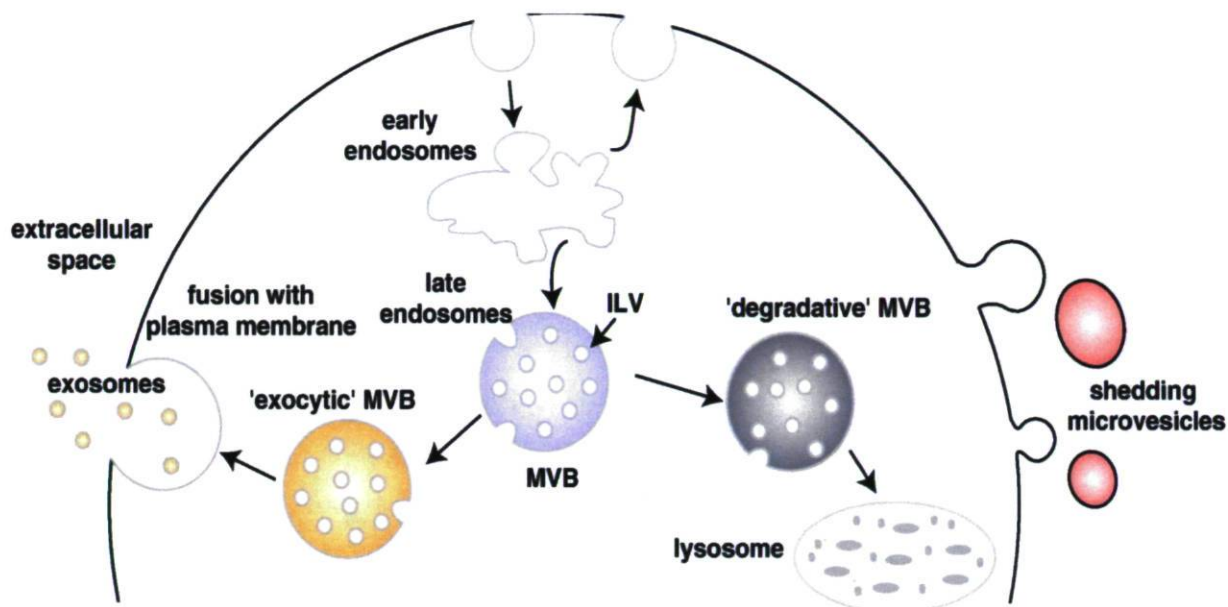


Figure 5 : Représentation schématique de la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire. D'après Mathivanan et al., 2010, *Journal of proteomics* (87)

La fusion des exosomes avec la membrane plasmique cellulaire fait intervenir une enzyme la GTPase (Rab27a) couplée à une protéine effectrice, Slp4-a. La famille des Rabs contrôle le trafic vésiculaire intracellulaire par le recrutement de protéines effectrices à la surface membranaire ou encore par la migration de certaines organelles tel l'endosome multivésiculaire jusqu'à la membrane plasmique cellulaire (89-90). La protéine synaptotgamine de type 4a (Slp4a), présente dans les endosomes tardifs, agit de concert avec Rab27a pour permettre la fusion et la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire (figure 6) (91-93).

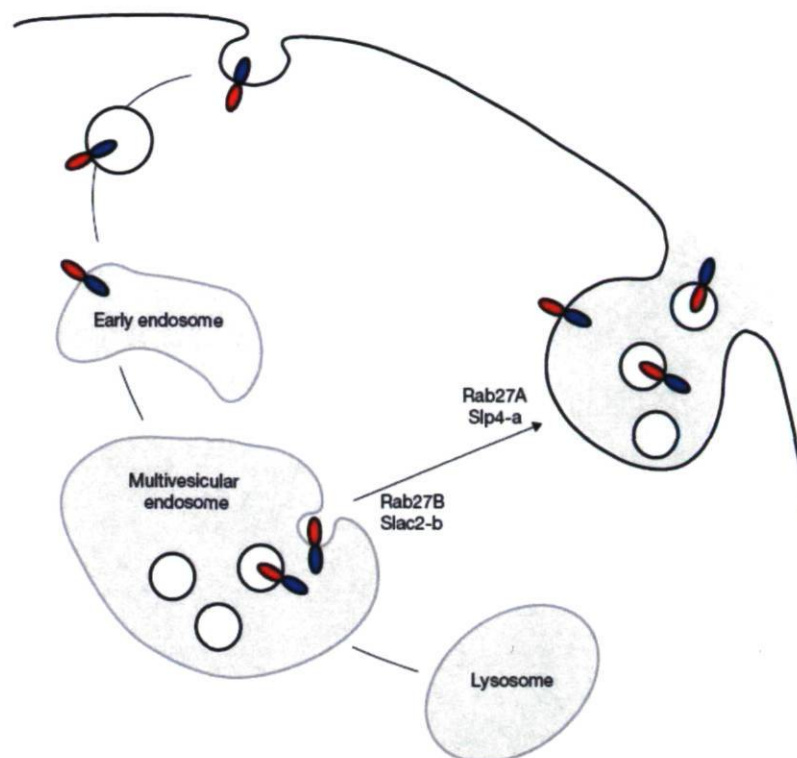


Figure 6 : Rôles de Rab27 dans le trafic vésiculaire.
D'après Pfeffer, 2010, *Nat Cell Bio.* (92)

1.3.3. Les différents types vésiculaires

Il existe un large éventail de vésicules se différenciant des exosomes soit par leurs tailles, leurs fonctions ou encore leurs compositions. Cette section traite des différents types de vésicules retrouvées dans les milieux extracellulaires telles que les microvésicules, les ectosomes, les vésicules apoptotiques et les particules virales. Le tableau 2 représente les caractéristiques de chaque type de vésicules discuté dans ce chapitre.

	Exosomes	Microvésicules	Ectosomes	Vésicules Apoptotiques	Particules virales de VIH-1
Taille	40 - 100 nm	100 - 1000 nm	50 - 200 nm	50 - 500 nm	100 nm
Vitesse de sédimentation	100,000 <i>g</i>	10,000 <i>g</i>	160,000 - 200,000 <i>g</i>	1,200 - 10,000 <i>g</i>	100,000 <i>g</i>
Densité de flottaison	1,13 - 1,19 g/ml	Inconnu	Inconnu	1,16 - 1,28 g/ml	1,16 - 1,18 g/ml
Composition lipidique	Cholestérol, phosphatidylsérine, sphingomyéline, céramide	Phosphatidylsérine	Phosphatidylsérie, cholestérol, diacylglycérol	Inconnu	Sphingolipides, riche en cholestérol
Types cellulaires	Cellules hématopoïétiques	Cellules tumorales, plaquettes, CD4	Neutrophiles, monocytes, érythrocytes	Tous les types cellulaires	CD4, Macrophages, LTCD4
Marqueurs	Tétraspansines, AChE, CMH-I/II, Alix, CD9, CD81, TSG101	Intégrines, Sélectines, CD40L	CR1	Inconnu	Env, gag, CMH-I/II, CD63
Origine	Compartiment intracellulaire	Membrane plasmique	Membrane plasmique	Inconnu	Compartiment intracellulaire et membrane plasmique

Tableau 2 : Caractéristiques de chaque sous type de vésicules sécrétées. Tableau modifié d'après Thery et al., 2009, *Nat. Rev. Immunol.* (127)

1.3.3.1. Les Microvésicules

Les microvésicules contrairement aux exosomes sont des vésicules de grande taille se situant entre 100 - 1000 nm. Elles sont libérées par les plaquettes (94), les cellules tumorales (95) ou encore par les CD4 (96). Les microvésicules sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement de la membrane plasmique cellulaire (97). Leur sécrétion est influencée par différents stimuli qui augmentent le niveau du calcium intracellulaire favorisant le bourgeonnement ou le remodelage de la membrane plasmique cellulaire (98).

La libération des microvésicules est un processus physiologique. Leur composition, comme pour la plupart des vésicules, dépend de la composition membranaire et du type cellulaire qui les libère. Les cellules tumorales libèrent continuellement des microvésicules (95, 99). On retrouve à leur surface des récepteurs cellulaires (CD40 ligand) (100-101), des molécules d'adhésions (sélectine, intégrines) (102) ou encore des métalloprotéines (103). Tout comme les exosomes, les microvésicules exposent à leur surface des phosphatidylsérines et peuvent être capturées par les LTCD4⁺ ou encore les cellules phagocytaires, par le biais de protéines *T-cell immunoglobulin and mucin protein-1/4* (Tim1/Tim4) exprimées par les macrophages et les LTCD4 (104-105). Il est cependant possible de discriminer les exosomes des microvésicules par la taille, mais aussi, par la sédimentation des microvésicules à des vitesses inférieures à 100,000 g.

1.3.3.2. Ectosomes

Les ectosomes sont des vésicules d'environ 50 – 200 nm portant à leur surface le complexe lytique d'attaque membranaire, C5b-C9 (106-107). Ces vésicules jouent un rôle dans la neutralisation du complément, dans la coagulation, et dans la maturation des CDs au site inflammatoire (106).

Différents types cellulaires sécrètent les ectosomes, entre autres, les monocytes (108), les neutrophiles (106), les érythrocytes (109) ou encore les plaquettes (110). La sécrétion se fait de manière spontanée ou en réponse à un stimulus. La libération d'ectosomes se fait par le bourgeonnement de la membrane plasmique cellulaire tel qu'illustré à la figure 7 (97, 106-107, 111).

La composition des ectosomes est similaire à celle de la membrane plasmique cellulaire. Ces vésicules contiennent des phosphatidylsérines (106), du cholestérol (112-113), du diacylglycérol (112) ou encore le récepteur du complément 1 (CR1) (111, 114).

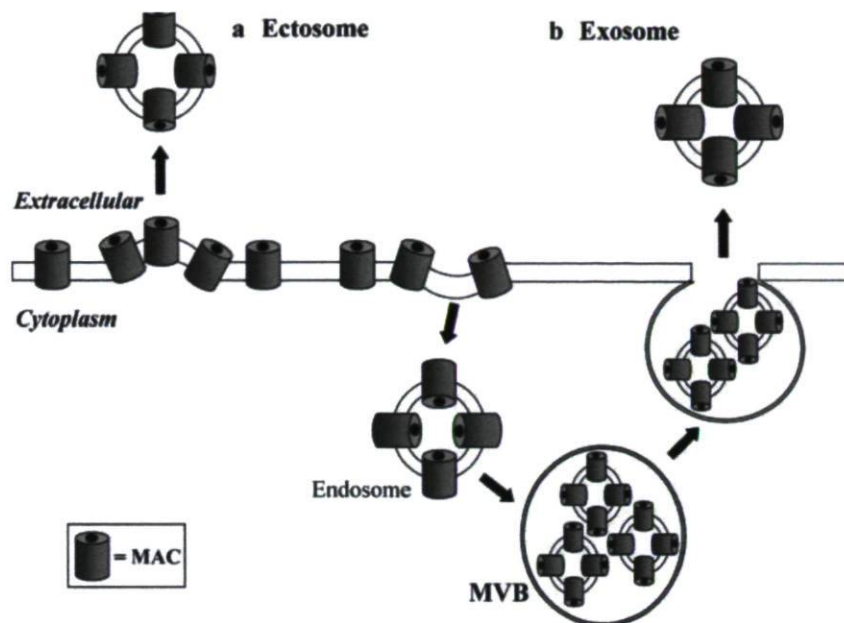


Figure 7 : Mécanismes de libération des ectosomes et des exosomes. D'après Pilzer et al., 2005, *Springer Semin Immun.* (111)

1.3.3.3. Vésicules apoptotiques

Les vésicules apoptotiques sont une population hétérogène d'environ 50 – 500 nm. La production des vésicules apoptotiques est déclenchée très tôt dans le processus de mort par apoptose (115-116). Les vésicules apoptotiques ou corps apoptotiques se forment par bourgeonnement (blebbing) de la membrane plasmique.

Lors du bullage de la membrane, le contenu protéique du noyau, de la membrane plasmique ou encore du réticulum endoplasmique de la cellule est emporté et incorporé dans les vésicules (116-117). Les vésicules apoptotiques sont très riches en histones (118) et en fragments de chromatines (119).

Dans le milieu extracellulaire, les vésicules apoptotiques sont phagocytées soit par les macrophages, soit par les CD par le biais de récepteurs spécifiques tels $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ et CD36

(120). Le résultat de cette phagocytose provoque la dégradation des corps apoptotiques, ou favorise la présentation antigénique aux LTCD4⁺ et aux LTCD8⁺ (121).

1.3.3.4. Les particules virales de VIH-1

De toutes les vésicules décrites plus tôt, les particules virales de VIH-1 sont celles qui partagent le plus de similarité avec les exosomes. Les particules virales sont des vésicules d'environ 100 nm. Ces particules sont produites lors d'une infection au VIH-1 dans les endosomes tardifs (122). D'après Gould et al., elles utilisent la voie de biogenèse des exosomes pour être libérées et ensuite infecter les cellules avoisinantes lors d'une infection au VIH-1 (122). Les particules virales ont une densité de 1,16 à 1,18 g/cm³. Tout comme les exosomes, elles sont composées de protéines virales Gag (123), de marqueurs endosomaux CD63 ou CMH-II (123-124), de protéines du cytosquelette (124), ou d'enzymes (125). Toutefois, contrairement aux exosomes, les virus ne contiennent pas les marqueurs CD14 et CD45 (126).

1.3.4. Contenu protéique

La composition protéique des exosomes est influencée par les signaux extracellulaires et varie suivant le type cellulaire dont ils proviennent. Tel que mentionné précédemment, les exosomes peuvent être libérés par les cellules hématopoïétiques, mais aussi par les cellules tumorales et les cellules épithéliales (128). Les exosomes se retrouvent dans des fluides biologiques variés tels que le plasma, le sang ou encore les urines (79, 129).

De ce fait, la composition protéique des exosomes est très variable. En effet, les exosomes libérés à partir des CPA, comme les LB et les CDs, sont riches en CMH-I/II, CD86 ou ICAM-1 qui sont des molécules jouant un rôle important dans la stimulation cellulaire. Les exosomes isolés à partir des urines contiennent eux des aquaporine-2 et des anhydrases carboniques (118, 130-131). L'état d'activation de la cellule est tout aussi important. En effet, les exosomes dérivés des CDs immatures, par exemple, contiennent moins de CMH-

II, CD86 ou encore CD40, comparativement aux exosomes des CDs matures (132). Dans cette section, je vais me concentrer sur quelques familles de protéines ou marqueurs rencontrés fréquemment dans les exosomes (figure 8).

Les membres de la famille des tétraspanines tels que CD37, CD63, CD81 sont fréquemment retrouvés dans les exosomes (133). Cette famille de protéines membranaires possède quatre domaines transmembranaires et est principalement localisée dans les membranes des endosomes tardifs. Les tétraspanines jouent un rôle dans l'adhésion (134), l'activation (135), la différenciation cellulaire (136) ou encore dans l'évasion tumorale (136-137). Elles sont capables de s'associer entre elles ou encore avec d'autres protéines comme les intégrines pour former un complexe d'adhésion (134, 138).

On retrouve aussi des protéines ancrées dans les membranes endocytosomales grâce au GPI (*glycophosphatidylinositol*) telles que l'acétylcholinestérase (AChE) ou encore les CD55, CD58 et CD59 (139). En fait, la présence de l'AChE dans les exosomes a été décrite en 1987 par Johnstone (140).

On y retrouve aussi de nombreuses molécules jouant un rôle dans la biogenèse des exosomes, dont des GTPases telles que RABs, ARF ou Rho (89, 141), des annexines (118), ainsi que des sous-unités de la machinerie ESCRT-I (142), dont il a été question auparavant. L'ensemble de ces protéines joue un rôle dans le trafic cellulaire, le tri et le transport des protéines au niveau des endosomes tardifs (143), tout comme la protéine Alix qui joue plusieurs rôles dans la biogenèse des corps multivésiculaires ou encore dans l'apoptose (118, 144).

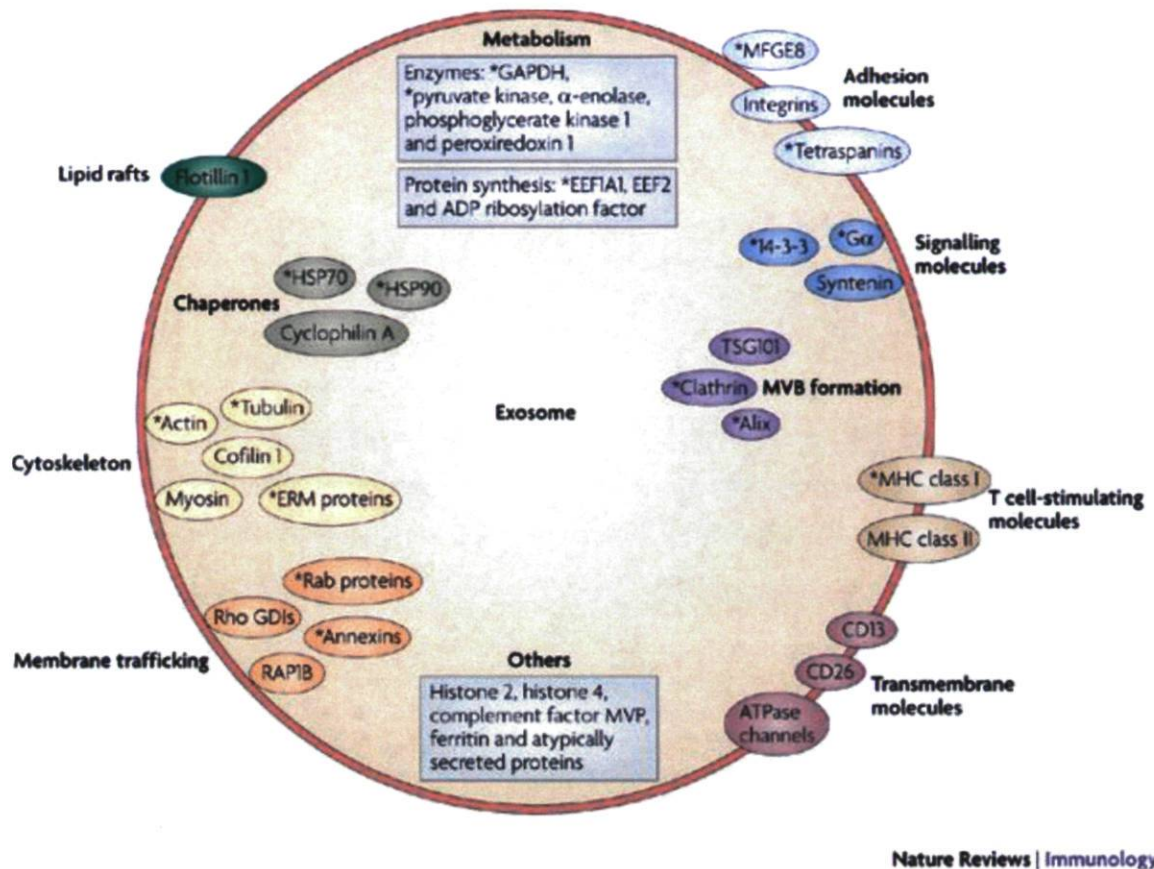


Figure 8 : Distribution du contenu protéique des exosomes. D'après Thery et al., 2009, *Nat. Rev. Immunology* (127)

1.3.5. Rôle des exosomes

Comme nous venons de le voir, la composition des exosomes varie selon le type de cellule qui les secrète et leur état d'activation. Par conséquent, le rôle des exosomes sera tout aussi variable. Dans ce chapitre, nous allons nous concentrer sur les différents rôles des exosomes dans la réponse immunitaire et dans la pathogénèse virale.

1.3.5.1. Rôle dans la réponse immune

Les exosomes originaires des CPA telles que les CD4 ou les LB portent à leur surface les molécules du CMH-I/II (130, 142, 145), des protéines chaperonnes (HSP) (146-148) ou des molécules de costimulation (CD86) (132) pouvant participer à l'induction de la tolérance ou à la présentation antigénique.

D'après Thery et al., les LTCD4 peuvent être activés directement ou indirectement par les exosomes provenant de CD4 (145). Après rencontre avec un Ag, les CD4 immatures libèrent des exosomes avec un complexe CMH-peptide (145). Ces exosomes seront capturés par des CD4 n'ayant jamais été en contact avec l'Ag (CD4 réceptrices). Après maturation, les CD4 réceptrices deviennent compétentes pour la stimulation des LT naïfs (145). De cette manière, le transfert du complexe CMH-peptide entraîne une amplification de la réponse immune par une augmentation du nombre de cellules portant le complexe CMH-peptide (132, 149).

Karleson et al. ont montré l'importance du CMH-II et des exosomes dans l'induction de la tolérance (150). Brièvement, des rats ont été exposés aux Ag d'ovalbumine. Le sérum a été prélevé et centrifugé. Le surnageant et le culot ont été isolés et mis en présence des cellules épithéliales naïves. Le groupe de Karleson et al. a observé que les cellules naïves mises en présence avec ces culots ont développé une tolérance à l'Ag d'ovalbumine contrairement aux cellules mises en présence du surnageant cellulaire ultracentrifugé. Après l'analyse du contenu du culot, ils observèrent un contenu enrichi en CMH. De plus, cette réponse reste

dépendante des CMH (150-151). Ces molécules ont été appelées les tolérosomes, aujourd'hui connues sous le nom d'exosomes (150).

La tolérance a aussi été corrélée avec la présence de la protéine HSP. En effet, la recherche sur les cellules tumorales a montré que la présence de la protéine HSP dans les exosomes brise la tolérance envers les Ag tumoraux et induit le rejet de la tumeur (147). Effectivement, les protéines HSP forment un complexe stable avec les Ag tumoraux cytoplasmiques pouvant être transportés dans les vésicules. Ainsi, les complexes HSP-Ag sont exposés aux cellules du système immunitaire provoquant une réponse immunitaire spécifique (147).

Finalement, la capacité des exosomes à induire la tolérance est exploitée dans les recherches sur les transplantations. Pêche et al. ont isolé des exosomes provenant de CD8 immatures d'une souris immunotransplantée. Les exosomes purifiés sont réinjectés à la même souris avec un inhibiteur de la maturation des CD8. Ils ont observé une réponse immunitaire suite à une présentation antigénique. Effectivement, les exosomes purifiés sont riches en CMH. Ces derniers présentent les peptides du soi, favorisant la survie du greffon à la suite de la greffe (152).

1.3.5.2. Thérapie antitumorale et vaccination

Les exosomes peuvent aussi être utilisés dans l'immunothérapie. Le groupe de Zitvogel et al. a mis en évidence le rôle des exosomes dans la thérapie antitumorale (153-154). Les CD8 du patient sont isolées et stimulées avec l'Ag tumoral, les exosomes provenant de ces cellules sont ensuite purifiés et réinjectés au même patient. De cette manière, les CD8 ou les CPA pourront internaliser les exosomes contenant l'Ag tumoral dans la niche peptidique des CMH-I/II pour faire la présentation antigénique aux cellules avoisinantes. Par cette méthode, le nombre de CPA se trouve amplifié (153).

Toujours dans la recherche antitumorale, depuis plusieurs années, les chercheurs s'intéressent aux exosomes pour une immunothérapie vaccinale contre le cancer de la peau (153, 155-157). Il a été montré que l'injection d'exosomes, produit à partir de CD8 mises en contact avec l'Ag cible, augmente le nombre de cellules tueuses dans le sang. Cette méthode s'avère être sécuritaire supprimant la croissance, voir l'éradication totale de la tumeur (153). De plus, Lamparski et al., ont montré que l'isolement de grande quantité d'exosomes permettant une production massive de vaccin était possible (157).

Récemment, Schnitzer et al. ont utilisé la méthode de purification d'exosomes à partir des CD8 qui ont été stimulées avec des Ag provenant du pathogène du *Leishmania* (158). Il s'avère que les souris qui ont reçu les exosomes étaient immunisées contre le parasite (158). En effet, les exosomes interagissent directement avec les LT et les activent, ou encore, les exosomes sont capturés par les CD8 qui à leur tour font la présentation antigénique aux LT naïfs. Ce même genre d'étude a d'abord été réalisée contre le parasite *Toxoplasma gondi* (159-161).

1.3.5.3. Rôle anti-inflammatoire

Au cours d'une étude sur l'arthrite rhumatoïde, maladie inflammatoire qui touche les articulations, Kim et al. ont montré l'effet anti-inflammatoire que pourrait avoir les exosomes isolés à partir de CD8 modifiées (162). En effet, les CD8 ont été transfectées préalablement avec un vecteur exprimant l'IL-10 ou traitées avec de l'IL-10 murine recombinante, une cytokine anti-inflammatoire. Ils ont observé que les exosomes, à eux seuls, pouvaient supprimer la réponse inflammatoire dans le modèle d'arthrite induit au collagène chez la souris DTH (*Delayed-type hypersensitivity*) (162). Cette réponse est dépendante du CMH-II. Toutefois, elle reste la plus efficace connue à ce jour et pourrait contribuer aux recherches cliniques pour l'élaboration de nouveaux traitements.

Au sein des mêmes recherches, une autre préparation d'exosomes exprimant la protéine transmembranaire FasL, de la famille des TNF, inhibe l'inflammation lors d'une arthrite induit par immunisation au collagène chez la même population de souris (163).

1.3.5.4. Pathogenèse virale

Plusieurs études décrivent le rôle des exosomes dans diverses pathogenèses virales. En effet, les exosomes participent à la transmission de plusieurs virus ou agents pathogènes tels que le virus de l'hépatite C (VHC), les virus herpétiques, le CMV et le VIH-1 ou encore les prions (164).

Masciopinto et al., ont montré que les VHC en s'attachant au CD81 des exosomes pouvaient circuler dans le milieu extracellulaire et utiliser ce récepteur pour infecter les cellules avoisinantes (165).

La famille des virus herpétiques tels que l'herpès simplex 1 (HHV-1) (166), le virus de l'herpès humain 6 (HHV-6) (167), le cytomégalovirus (CMV) (168) ou encore Epstein-Barr virus (EBV) (169) détournent le système immunitaire via les exosomes.

Une étude récente sur le HHV-1 a montré que la présence de la glycoprotéine B (gB) induit une augmentation de la synthèse et de la libération des exosomes (166). De plus, la gB interagit avec les CHM-II au niveau des endosomes tardifs (166). De ce fait, le complexe gB-CMH est transféré aux cellules avoisinantes via la voie de libération des exosomes. Ainsi, HHV-1 module la réponse immunitaire en présentant les Ag viraux.

Il a été montré que le HHV-6 utilise la voie de biogenèse des exosomes pour sa maturation et libération (167). Effectivement, le HHV-6 bourgeonne dans les endosomes tardifs et est libéré simultanément avec les exosomes. De plus, les exosomes libérés dans le milieu extracellulaire expriment les protéines virales gB et gM permettant leurs présentations aux LT.

Donc, le virus et la présence des gB et gM lorsque libérés dans le milieu extra cellulaire entraînent une réplication massive du virus, et donc de sa propagation.

Walker et al. ont montré que des exosomes purifiée à partir de cellules épithéliales mises en contact avec le CMV induit une réponse immune adaptative. En effet, la libération d'exosomes exprimant les antigènes viraux induit l'activation des LTCD4 via le CMH (168). Les exosomes dérivés de ces cellules contiennent le gB qui, comme pour le HHV-1, est présenté aux LT.

Finalement, l'EBV, quant à lui, inhibe l'activation des LT en induisant leur anergie (169). En effet, les exosomes sécrétés par les cellules infectées, vont exprimer les protéines virales, LMP1, qui sont connues pour inhiber l'activation des LT par plusieurs types de stimuli dont la stimulation des récepteurs CD3/CD28.

Les mécanismes de transmission d'une protéine dite infectieuse, le PrP^{sc}, utiliseraient la voie de sécrétion des exosomes. Cette protéine est reliée à la maladie neurodégénérative connue sous le nom de la maladie du prion. Le PrP^{sc} peut être recruté au niveau des radeaux lipidiques et être impliqué dans la biogenèse et la structure des exosomes (170). Le PrP^{sc} a, de plus, la propriété de résister à la protéolyse cellulaire dans les lysosomes, et peut être libéré dans le milieu extracellulaire en association avec les exosomes. Les exosomes libérés pourront être capturés par les cellules avoisinantes favorisant la propagation de la protéine infectieuse (164). De plus, il a été montré que la libération des PrP^{sc} était favorisée en présence d'une infection à un rétrovirus, cependant les mécanismes sont encore mal connus (171).

1.3.5.5. La pathogenèse du VIH-1

Les exosomes jouent plusieurs rôles dans la pathogenèse de l'infection au VIH-1. Ils favorisent l'évasion ou encore la réplication. Des études récentes ont montré que les exosomes provenant de LTCD8 de patient pouvaient avoir un effet antiviral sur le virus (172). Effectivement, ces exosomes ont inhibé la réplication virale en bloquant la transcription au niveau du promoteur LTR. L'enzyme APOBEC3G est une cytidine désaminase connue comme étant un système de défense cellulaire immunitaire intrinsèque contre les virus en général et contre le VIH-1 (173). L'APOBEC3G est présente dans les exosomes. Il agit comme facteur de restriction dans les cellules ayant capturé ces exosomes (173). C'est-à-dire qu'une diminution de l'infection est observée.

Le VIH-1 a développé plusieurs stratégies pour échapper au système immunitaire. L'une d'entre elles, porte le nom de cheval de Troie (122). En effet, lors de l'infection en *trans*, le virus et son récepteur se retrouvent internalisés dans les endosomes tardifs en présence des exosomes (122, 174-176). La libération du contenu endosomal dans le milieu extracellulaire entraîne la libération des exosomes et des particules virales. Ainsi, le virus et les particules se propagent et sont capturés par les cellules avoisinantes (73, 122, 145, 176).

Il a été montré que le virus utilise les CD4 pour infecter les LTCD4 par le mode *trans* (73). En effet, lorsque les particules de VIH-1 sont produites et libérées dans le milieu extracellulaire par les LTCD4, le virus imite les propriétés des exosomes pour être internalisé aussi par les CD4 matures. De cette manière, le VIH-1 est séquestré dans l'appareil endosomal incognito jusqu'à sa libération. Ainsi, les particules virales internalisées sont transférées et infectent encore plus efficacement les LTCD4 avoisinants tel qu'illustré dans la figure 9 (73).

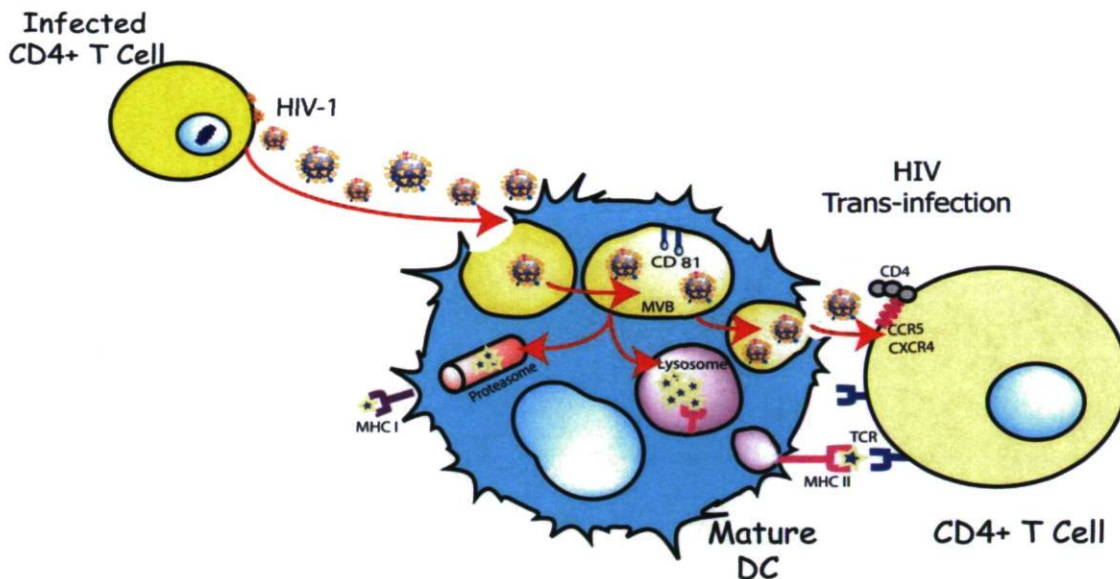


Figure 9 : Transmission du VIH-1 par le modèle en *trans* exploitant les propriétés des exosomes à être internalisés dans les CD4 matures. D'après Izquierdo-Useros et al., 2009, *Blood* (73).

Les exosomes pourraient aussi favoriser la mort par apoptose des LTCD4 lors de l'infection au VIH-1 (177). En effet, certaines protéines virales telles que Nef sont connues pour augmenter la prolifération des vésicules dans les compartiments endosomaux, et par conséquent la production d'exosomes (178-182). La protéine Nef, en plus d'être incorporée dans les exosomes, augmente leur production dans les cellules HeLa et induit leur libération dans le milieu extracellulaire (177). Par conséquent, lorsque les exosomes sont libérés dans le milieu extra cellulaire, la présence de la protéine Nef cause l'activation et l'apoptose des LTCD4 avoisinants (177, 183).

1.4. L'Apoptose

1.4.1. Mécanisme de l'apoptose

La pathogenèse du VIH-1 est très souvent associée à la progression de la déplétion des LTCD4 (184-185). La déplétion des LTCD4 est, entre autres, liée à la mort cellulaire programmée appelée l'apoptose (61, 186). L'apoptose est un processus physiologique, régulé génétiquement, qui est impliqué dans l'homéostasie cellulaire, dans le développement normal et dans la survie de nombreux organismes (187-188). Elle se produit également lorsque les cellules sont infectées par des virus ou par des microbes (189-191). Tel qu'illustré à la figure 10, il existe deux voies principales d'apoptose, dont la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (192).

L'apoptose et la nécrose sont deux mécanismes différents de mort cellulaire. D'abord, la nécrose surgit lors de la destruction passive des cellules au cours d'une pathologie. Elle se caractérise par une lyse cellulaire libérant tout son contenu dans le milieu extérieur, engendrant une réponse inflammatoire (193). Contrairement à la nécrose, l'intégralité des compartiments internes de la cellule est préservée lors de l'apoptose. Ce phénomène provoque une condensation de la chromatine, un rétrécissement du cytoplasme, la perte de l'asymétrie lipidique de la membrane plasmique, ainsi que le bourgeonnement de la membrane plasmique conduisant à la formation des corps apoptotiques (187).

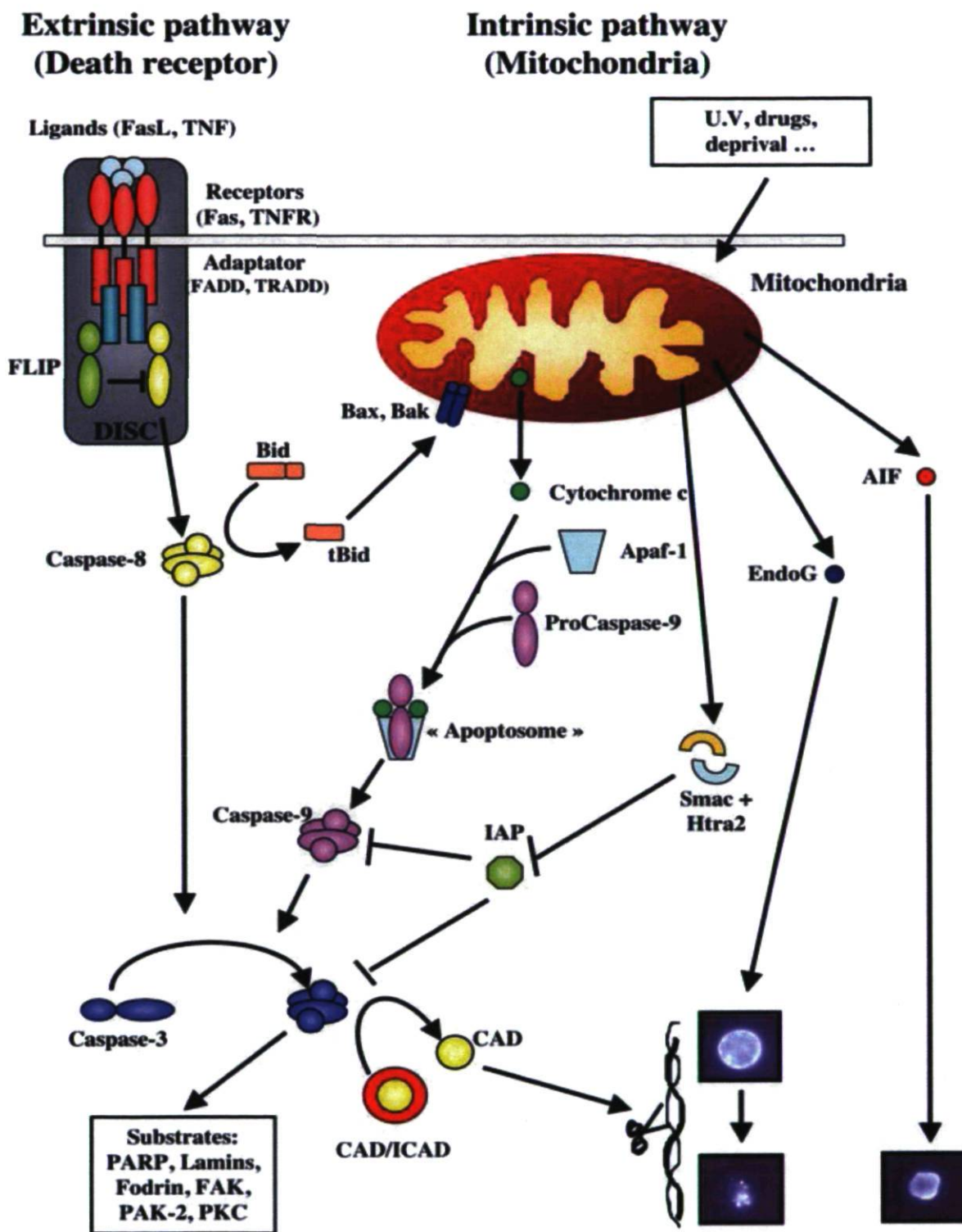


Figure 10 : Schéma général de l'apoptose : voie intrinsèque et extrinsèque. D'après Petit et al., 2003, *Biochem* (194).

L'apoptose peut être déclenchée par de nombreux stimuli tels que l'activation des récepteurs aux domaines de mort (195), la carence en facteur de croissance, les dommages à l'ADN ou les agents cancéreux (192, 196-197). Suivant le signal, il y a activation des caspases (*Cysteine-dependent ASPartate-directed Proteases*) par la voie extrinsèque ou par la voie intrinsèque (198). Les deux convergent vers l'activation de la caspase-3 tel qu'illustré à la figure 10.

La voie intrinsèque ou la voie mitochondriale est, entre autres, dépendante de la formation de l'apoptosome, un complexe formé de la protéine Apaf-1, cytochrome c et dATP/ATP. La formation de l'apoptosome entraîne le recrutement et l'activation de la caspase 9 (199). Une voie intrinsèque indépendante des caspases a aussi été décrite (194). La voie des *Apoptosis inducing factor* (AIF) ne nécessite pas l'activation des caspases pour être active. Lors de l'induction de l'apoptose AIF transloque de la mitochondrie au cytoplasme et au noyau, où il induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (194, 200).

La voie extrinsèque ou la voie des récepteurs de mort cellulaire, implique l'activation et le recrutement de protéines transmembranaires capables d'induire l'activation des cascades apoptotiques. Le recrutement des protéines adaptatrices est dépendant du ligand qui se lie à son récepteur complémentaire. Les récepteurs en question, par exemple, appartiennent à la famille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*), leur activation par le TNF entraîne l'activation des caspases 8 et 9 (195, 201).

1.4.2. Death-Associated-Protein 3

Dans ce mémoire deux protéines participant au processus de l'apoptose retiennent notre attention, il s'agit de la *Death-associated-protein 3* (DAP3) et de *Apoptotic peptidase activating factor 1* (Apaf-1). La protéine adaptatrice DAP3 ou MRPS29 (*mitochondrial ribosomal protein S29*) a été isolée pour la première fois par Kissil et al. en 1995 (198). Le gène qui code pour DAP3 se trouve sur le chromosome 1q21 et est transcrit en un ARNm

de 1,7 kb (202). Deux variantes provenant d'épissage en 5' UTR ont été retrouvées, chacune codant pour la même protéine (Figure 11) (203). DAP3 est principalement retrouvée dans le cytoplasme ou encore faisant partie de la sous unité ribosomale 28 S de la mitochondrie (204). En effet, c'est une protéine proapoptotique ubiquitaire, de 396 aa soit 46 kDa (203). Elle possède des motifs P-loop indispensables à la liaison aux nucléotides et au GTP (203, 205). Une mutation dans les motifs P-loop diminue l'efficacité de DAP3 à induire l'apoptose (202).

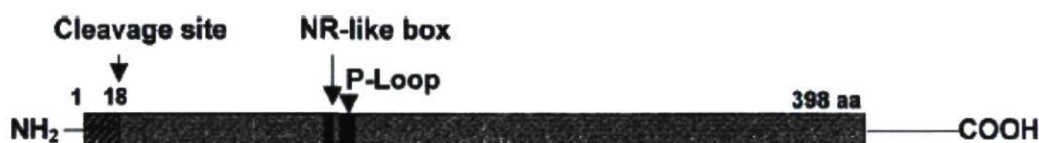


Figure 11 : Structure de la protéine DAP3. D'après Morgan et al., 2001, *Biochem Biophys Res Commun* (203).

Initialement, la DAP3 a été identifiée comme une molécule responsable de l'activation de l'apoptose par la voie des IFN- γ (198, 202, 204). Kissil et al. ont montré que la diminution de l'expression du gène DAP3 par transfection avec des ARN antisens protège les cellules HeLa de l'effet de l'IFN- γ (198). Effectivement, l'IFN- γ est connu pour stopper la prolifération cellulaire et provoque la mort des cellules. À l'inverse, la surexpression de DAP3 était suffisante pour induire l'apoptose des cellules HeLa (198). Peu de temps après, le même groupe de recherche a montré l'implication de DAP3 dans la mort cellulaire par la voie des récepteurs de mort au TNF- α et Fas (202).

Miyazaki et al. ont montré le rôle de DAP3 dans l'induction de l'apoptose par le ligand de mort, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et la protéine FADD (*Fas-associated death domain protein*). En effet, la protéine DAP3 est une protéine adaptatrice

des domaines de mort, DR4 et DR5, liant la protéine FADD au ligand TRAIL (206). De plus, des études récentes ont montré que la protéine adaptatrice DELE (*death ligand signal enhancer*) est essentielle à l'attachement de DAP3 aux récepteurs DRs (*Death receptors*). L'absence de DELE réduit considérablement l'activation des caspases-3, -8, et -9 (207). Ces interactions semblent donc déclencher l'apoptose par la voie caspase 8 (figure 12) (206). L'activation de cette cascade enzymatique entraîne la désorganisation de la membrane mitochondriale suivie de la mort de la cellule. La liaison de DAP3 au ligand TRAIL entraîne aussi le détachement des cellules épithéliales adhérentes de la matrice extracellulaire, plus communément appelé anoikis (208). En résumé, DAP3 agit en aval en tant que stimulus proapoptotique activé par les récepteurs de morts, et en amont par le déclenchement de l'activation des caspases (198, 202-203).

Finalement, des études sur plusieurs rôles reliés à l'apoptose dépendante de DAP3 ont été décrites dans la littérature. La présence de DAP3 induit la fragmentation mitochondriale en réponse à des stimuli de stress (205). DAP3 dans la sénescence agirait également comme régulateur de stress oxydatif déclenchant la mort prématurée des cellules (209). Enfin un rôle connu pour DAP3 dans l'apoptose des lymphocytes T, et plus précisément dans la sélection négative via l'activation du TCR et des récepteurs Nur77 (210).

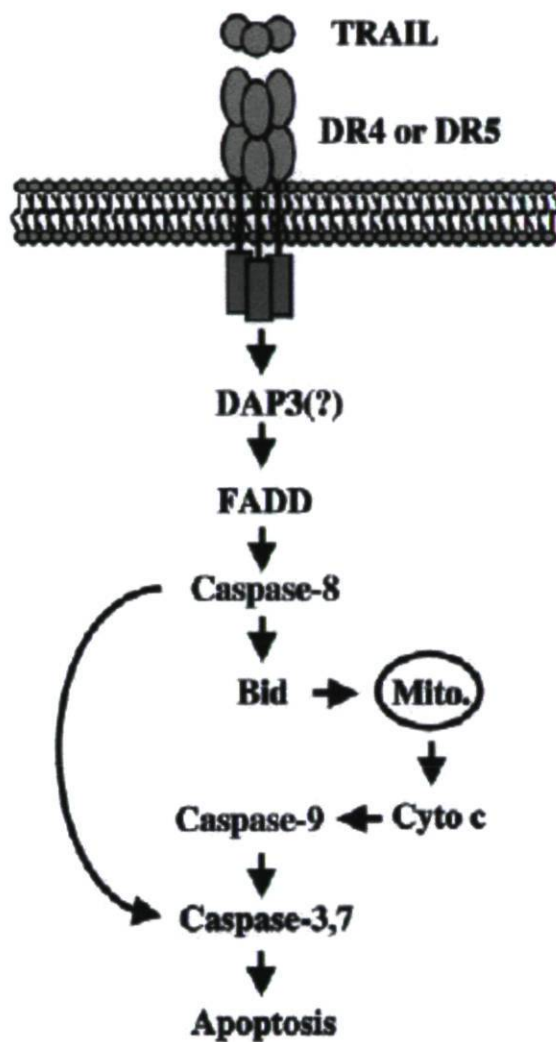


Figure 12 : Induction de l'apoptose par l'activation de TRAIL. D'après Kim et Seol, 2003, *Mol. Cells* (211).

1.4.3. Apoptotic peptidase activating factor 1

Apaf-1 est une protéine adaptatrice de 130 kDa impliquée dans la mort cellulaire par la voie de l'apoptose mitochondriale. Quatre variantes provenant d'épissage alternatif d'Apaf-1 sont connus. Toutes les formes contiennent les 3 domaines essentiels à l'activation et au recrutement de la caspase 9. Les 3 domaines sont: a) Le domaine N-terminal CED-3-like appelé CARD, qui a pour rôle le recrutement des caspases, b) une région P-loop site de liaison des nucléotides et du Mg^{2+} , c) la région régulatrice C-terminale WD-40 jouant un rôle dans les interactions avec le cytochrome c (figure 13) (212).

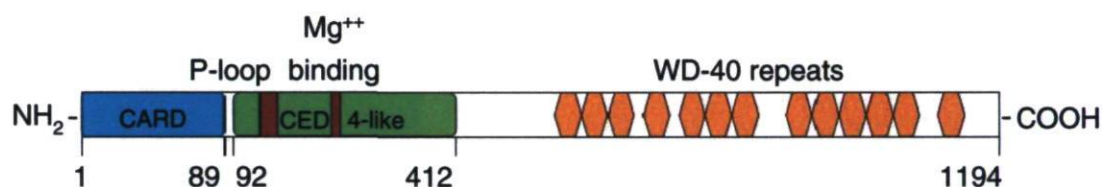


Figure 13 : Structure de la protéine Apaf-1. D'après Campioni et al., 2005, *Exp Dermatol* (212).

C'est lors de la perméabilisation de la membrane de la mitochondrie, suite à un stress, que le cytochrome c est libéré dans le cytoplasme. Le cytochrome c et l'ATP/dATP pourront se lier à Apaf-1 pour former un complexe heptamérique appelé l'apoptosome (figure 13) (213-214). À la suite de la formation de l'apoptosome, il y aura recrutement de la caspase 9 par l'interaction du domaine CARD avec le prodomaine de la procaspase-9 qui aura pour effet le recrutement et l'activation de la caspase 9. L'activation de la caspase 9, déclenche l'activation de la caspase 3, un ensemble de cascades enzymatiques qui se terminent par le remodelage de la matrice mitochondriale, la condensation de la chromatine, la rupture de la membrane nucléaire ou encore la formation de corps apoptotiques, suivi de la mort de la cellule. Les différents signaux de stress responsables de l'activation de la cascade

enzymatique sont des dommages à l'ADN cellulaire, des agents toxiques ou encore des agents infectieux (197).

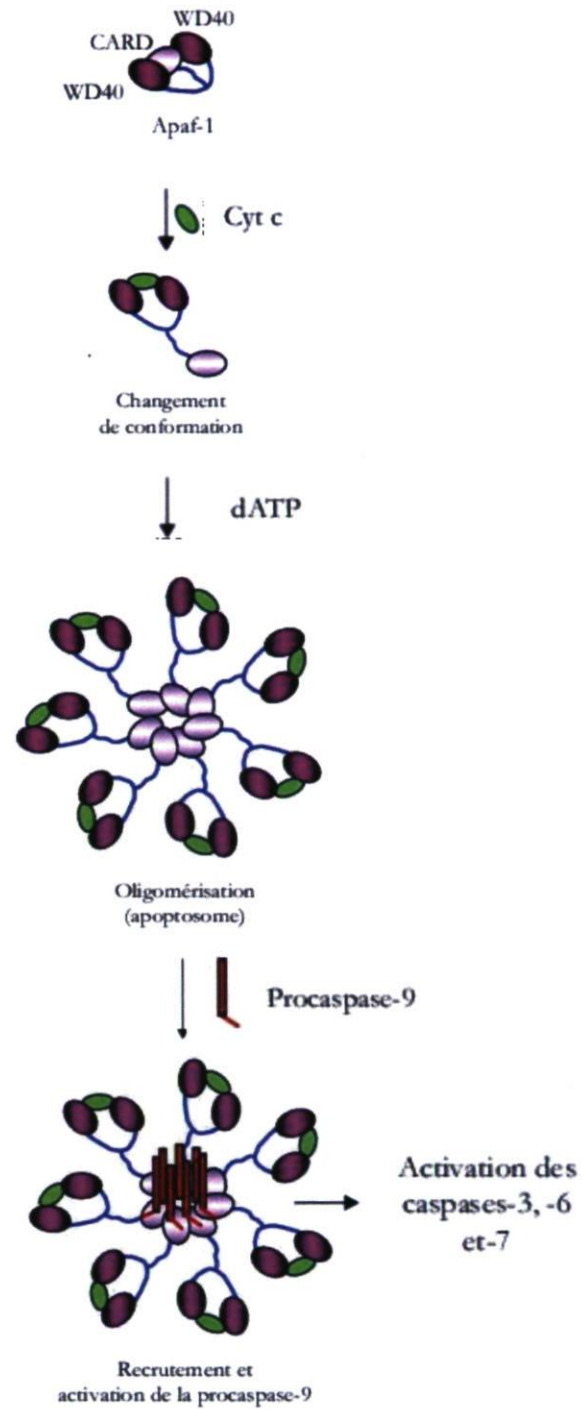


Figure 14 : Formation de l'apoptosome. Modifié d'après Ségal-Bendirdjan et al., 2005, *Bull cancer* (192)

1.5. Hypothèse

Malgré les nombreuses recherches qui sont menées sur la compréhension de l'infection au VIH-1 ainsi que son impact sur les réponses du système immunitaire, aucun médicament, ni vaccin n'est disponible pour éliminer le virus. La déplétion massive des LTCD4 dans les ganglions lymphatiques, seulement 15 jours après l'infection, est un élément important dans le développement vers la phase du SIDA. Cependant, cette étape n'est pas entièrement comprise. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, les causes de l'immunodéplétion des LTCD4 sont reliées à l'augmentation de l'apoptose cellulaire des cellules avoisinantes, comme des cellules infectées, à la toxicité directe liée à l'infection principalement des LTCD4 et à la mort des LTCD4 infectés par l'action cytotoxique des LTCD8. Cette déplétion est tellement massive et rapide que possiblement d'autres facteurs encore inconnus contribuent à cette disparition drastique. Une des thématiques de recherche du laboratoire porte sur l'étude du rôle des exosomes dans cette déplétion.

Des résultats préliminaires obtenus et présentés à la figure 15 montrent que les CDs mis en contact avec le VIH-1 provoquent une augmentation d'exosomes dans le milieu extracellulaire (panneau A). La quantité en exosomes est évaluée par la mesure de l'activité de l'Acétylcholine estérase (AChE) (panneau A et B) confirmant que la quantité d'exosomes est plus importante dans le surnageant des CDs mises en contact avec le VIH-1. Ensuite, dans le panneau C, on peut voir, par la mesure de la protéine de la capsid P24, que le gradient de vélocité est efficace pour séparer les particules virales des exosomes. Enfin en dosant l'infectivité des différentes fractions sur des LTCD4 par la mesure de l'ARNm épissé du gène Tat (panneau D), nous avons confirmé que les particules virales des fractions 13 à 18 étaient infectieuses et que les fractions contenant les exosomes étaient exemptes de particules infectieuses. Les fractions 9,6 à 12 ont donc été analysées en protéomique. Cette analyse a révélé un contenu enrichi en protéines jouant un rôle dans la survie cellulaire (DAP-3, Apaf-1, Slp 76). Par la suite, d'autres expérimentations ont montré que des préparations virales provenant de cellules HEK-293T, déplétées en exosomes augmentaient la viabilité des LTCD4. L'ensemble de ces observations

préliminaires montre d'une part que les CDs en contact avec le VIH-1 libèrent plus d'exosomes dans le milieu extracellulaire et que ces exosomes contiennent des protéines apoptotiques. De plus, les préparations virales dépourvues en exosomes favorisent la survie des LTCD4.

D'après ces résultats préliminaires et notre compréhension sur du sujet, nous avons émis l'hypothèse que les exosomes libérés par les CDs mises en contact avec le VIH-1 pouvaient contribuer à la déplétion des LTCD4⁺ lors de la primo-infection.

Le premier objectif de notre étude était de vérifier la présence d'Apaf-1 et de DAP3 dans les CDs mises en contact avec le VIH-1 ainsi que les types cellulaires susceptibles de produire le virus, tels que les leucocytes mononucléés ou les PBMCs, les HEK-293T, et les LTCD4. Ces différents types cellulaires ont aussi été stimulés par divers agonistes tels que les cristaux d'UMS, les ionophores, le H₂O₂ ou encore du virus atténué (AT2) et la présence de DAP3 a été évaluée dans les exosomes provenant de ces différentes conditions de stimulations. La deuxième étape du projet, était de mesurer la prolifération des LTCD4 en présence des exosomes purifiés à partir des CDs autologues stimulées avec le VIH-1. Encore une fois, pour mettre au point le protocole, nous avons travaillé avec les PBMCs mis en contact avec des cristaux d'UMS et les PBL autologues. Enfin, le dernier objectif du projet était de mettre au point la diminution de l'expression de DAP3 dans les CDs par transfection avec des ARN antisens.

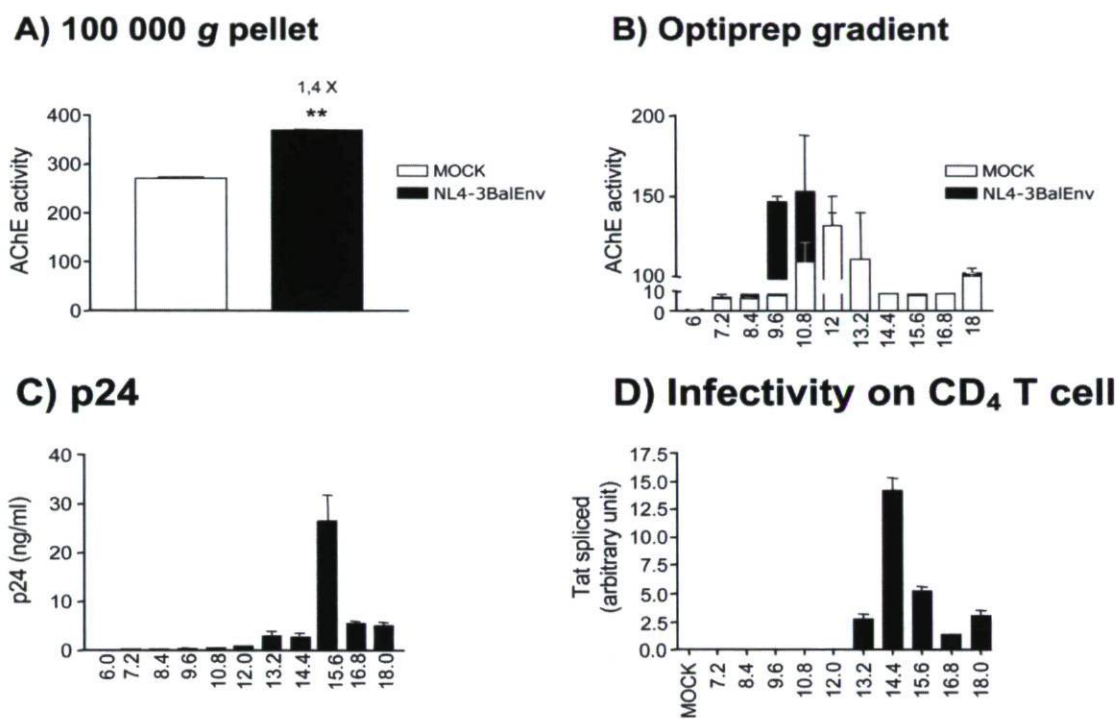


Figure 15 : Production d'exosomes par les cellules dendritiques stimulées avec le VIH-1. Les CD immatures ont été incubées avec du virus purifié NL4-3Balenv produit à partir de PBMC ou avec le contrôle négatif Mock. Après trois lavages au PBS, les CD immatures ont été incubées 24h de plus. Le surnageant a été récolté et centrifugé. Le culot contenant les exosomes et le virus a été resuspendu dans 400 μ l de PBS. Les exosomes ont été séparés du virus par un gradient de vélocité (Optiprep™). Les exosomes ont été quantifiés dans le culot à 100,000 g (panneau A) et dans les différentes fractions Optiprep™ (panneau B) par la mesure de l'activité de l'AChE. Le virus a été quantifié avec le test ELISA contre la protéine p24^{gag} (panneau C). L'infectivité du virus a été évaluée par un PCR en temps réel dirigé contre le gène épissé Tat (panneau D).

2. CHAPITRE II - Matériel et Méthodes

2.1. Réactifs et Anticorps

2.1.1. Réactifs

Le Ficoll (*Lymphocyte Separation Medium*), le RPMI 1640, le DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*), le PBS, la glutamine, la pénicilline et la streptomycine ont été achetés chez Wisent inc. La primocine a été achetée chez Amaxa Biosystems. Le GM-CSF nous a généreusement été donné par Cangene. Le plasmide NL4-3Balenv provient du laboratoire de R. Pomerantz, Thomas Jefferson University à Philadelphia. Les cytokines IL-4 et l'IFN- γ ont été achetées chez R & D systems, et le PHA-L provient de chez Roche en Ontario au Canada. Les cristaux d'urate monosodique (UMS) ont été fabriqués dans le laboratoire du Dr Paul Naccache, Université Laval à Québec, tel que décrit (Naccache et al., 1991). L'Accutase est un produit disponible chez Innovative Cell Technologie Inc. Les oligonucléotides ont été achetés chez Integrate DNA Technologies. Les produits pour la transfection comme l'oligofectamine et le milieu OptiMEM sont des produits de chez Invitrogen Corporation. Le kit de dosage de protéine Pierce® BCA Protein Assay Kit a été acheté chez Fisher. Le LPS, l'acéthylthiocholine et le 5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) sont disponibles chez Sigma-Aldrich. Les membranes de PolyVinylideneFluoride (PVDF) sont disponibles chez Millipore Corporation. La Renaissance Detection Système a été acheté chez NEN Life Science. L'ionophore de calcium (A23187) a été acheté chez Calbiochem.

2.1.2. Anticorps

L'anticorps polyclonal anti-DAP3 (cat: 554001) a été acheté chez BD Biosciences. L'Anti-Apaf-1 (19F461), sc-56000, et l'anti-Actine (I-19), sc-1616, l'anti-HLA-DR (DA6.147) ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnologies inc. L'anti-P24 (183-H12 5C) a été fourni par

le AIDS Repository Reagent Program. Tous les anticorps secondaires proviennent de chez Jackson Immuno Research Laboratories inc. USA.

2.2. Culture cellulaire

Toutes les cellules, sauf indication contraire, sont mises en culture dans du RPMI 1640 complété avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et ultracentrifugé à 100 000 g toute la nuit auquel on a ajouté de la pénicilline à 100 U/mL, de la streptomycine à 100 µg/mL, de la L-glutamine à 2 mM (PSG) et de la primocine à 100 µg/mL.

2.2.1. PBMC

Les cellules mononucléées humaines, les PBMCs, sont isolées à partir du sang de donneurs sains. Le sang est centrifugé sur gradient de Ficoll (*Lymphocyte Separation Medium*) à 1000 g pendant 30 minutes à température de la pièce. On prélève l'anneau de cellules mononucléées : les PBMCs. Après 3 lavages avec une solution saline de HBSS, les PBMCs sont ensuite mises en culture dans du milieu RPMI 1640 complet.

2.2.2. CD8

Les cellules CD14⁺ sont isolées à partir des PBMCs resuspendues à 1×10^8 cellules/mL dans une solution de PBS supplémentée d'EDTA à 2 mM et de BSA 0,5%. Les cellules sont séparées par une sélection positive en suivant les explications du manufacturier, tel que décrit (215). Après séparation, les cellules CD14⁺ sont distribuées dans une plaque de 6 puits à 3×10^6 cellules/puits dans du RPMI 1640 complet et mises en culture à 37°C. La différenciation des monocytes en CD8 immatures est amorcée par l'ajout de 1000 U/mL de GM-CSF et 200 U/mL d'IL-4. Les deux cytokines sont ensuite ajoutées aux jours 2 et 4.

2.2.3. Lymphocytes T CD4⁺

Les LTCD4⁺ autologues ont été purifiées à partir de la fraction négative obtenue à la suite de la sélection positive des monocytes décrite plus haut. Cette fois on utilise une sélection négative des cellules CD4⁺, tel que décrit (215). Les LTCD4⁺ sont resuspendues à 2x10⁶ cellules/mL dans du RPMI 1640 complet et mises en culture à 37°C. Après 2 jours de culture les cellules sont activées avec 1 µg/mL de PHA-L et 30 U/mL d'IL-2 pendant 3 jours.

2.2.4. Les cellules HEK-293T

La lignée cellulaire HEK293T est cultivée dans du DMEM complet avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et ultracentrifugé à 100 000 g toute la nuit, de plus, on y ajoute de la pénicilline à 100 U/mL, de la streptomycine à 100 µg/mL, de la L-glutamine à 2 mM (PSG).

2.3. Stimulation

2.3.1. Les cellules HEK-293T

5 x 10⁶ cellules HEK-293T dans du DMEM complet sont stimulées avec l'ionophore de calcium (A23187) à 1 µM final et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30 µM final. Les surnageants sont récoltés après 48h à 37°C et conservés pour la purification des exosomes. Les cellules adhérentes sont décollées avec l'Accutase®, et resuspendues à 1 x 10⁷ cellules/mL avec du tampon d'échantillon 2x (SB2x) (composition du SB1x : 62.5 mM Tris-HCL (pH 6.8), 4% (m/v) SDS, 5% (v/v) 2-ME, 8.5% (v/v) glycerol, 2.5mM orthovanadate, 0.025% bromophenol blue) et les échantillons sont bouillis à 100°C pendant 7 minutes.

2.3.2. Les CD_s et les PBMC_s

Après 5 jours de différenciation, les CD_s immatures sont resuspendues et reprises à 5×10^5 cellules/mL dans du RPMI 1640 complet. Les cellules sont distribuées dans des plaques de 24 puits et stimulées soit avec des cristaux d'UMS à 0.3 mg/mL final ou encore avec 50 ng d'une préparation virale de NL4-3Balenv déplétée en exosomes ou un volume équivalent de HBSS (contrôle négatif). Le surnageant récolté après 48h d'incubation à 37°C est conservé pour la purification des exosomes. Les cellules adhérentes sont décollées à l'Accutase®, reprises à 1×10^7 cellules/mL dans du tampon d'échantillon 2x à 100°C et bouillies pendant 7 minutes.

2.4. Transfection des PBMC_s et des CD_s avec des ARN anti-sens anti-DAP3

Des oligonucléotides phosphodiester sens (S) S : 5'-ATGATGCTGAAAGGAATA-3' et anti-sens (AS) AS1 : 5'-TTTCAGCATCATCCTTGC-3' et AS2: 5'-TATTCCTTTCAGCATCAT-3' ont été choisis selon l'article suivant (206). Brièvement, les CD_s ou PBMC_s diluées dans du RPMI sans FBS et sans PSG ont été distribuées dans une plaque de 6 puits à 3×10^6 cellules/puits avant d'être incubées avec le mélange d'oligofectamine et d'ARN anti-sens à 200 pmol ou 400 pmol final, tel que décrit dans le protocole d'Invitrogen. Nos contrôles sont constitués d'ARN sens ou seulement d'oligofectamine. Les cellules sont incubées pendant 5h ou 24h, à 37°C. Dans chaque cas, après 3 heures incubation du RPMI avec 30% de sérum est ajouté.

2.5. Isolement des exosomes

Le surnageant des cellules stimulées est prélevé et centrifugé à 425 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant est filtré avec un filtre à 0.22 µm, ou encore centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes. Le même surnageant est ensuite ultracentrifugé à 100 000 g avec la centrifugeuse Optima L-90K (Beckman Coulter) pendant 1h avec un rotor 70Ti à

4°C. Le culot est lavé en ajoutant un volume de PBS et est recentrifugé à 100 000 *g* avant d'être resuspendu dans du PBS dans un volume final de 100 μ L. Les échantillons d'exosomes sont conservés pour la mesure de l'activité de l'AChE, pour un immunobuvardage, ou encore pour un essai de prolifération.

2.6. Prolifération

Les LTCD4 à 1×10^5 cellules/mL sont diluées dans du RPMI 1640 complet et distribuées dans une plaque de 96 puits. 25 μ L d'exosomes sont ajoutés aux LTCD4. Les CD4 diluées dans du RPMI 1640 sont ajoutées aux puits à raison de 33 000 cellules/puits pour obtenir un volume final de 200 μ L/puits et incubées à 37°C pendant 72h. Après 72h d'incubation, les échantillons sont traités avec 20 μ L/puits du réactif MTT (Thiazolium Bromide, Sigma-Aldrich) à 12 mM (soit 5 mg/mL dilué dans du PBS). Après 4h d'incubation à 37°C, 5% CO₂ on ajoute 100 μ L/puits d'une solution SDS-HCL (0,1 g/mL de SDS dans 0.01 M de HCL). L'augmentation de la densité optique est proportionnelle à la prolifération. La lecture se fait à 570 nm, 24h après cette dernière incubation à 37°C, 5% CO₂.

2.7. Immunobuvardage

Les lysats des cellules et des exosomes sont migrés sur mini-gel SDS-PAGE 10% pendant 1h30 à 100 V. Le transfert est fait sur des membranes de PolyVinylideneFluoride (PVDF). L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration des membranes avec du Rouge Ponceau-S et par lavage avec le tampon TBS (Tris buffer Saline) Tween-20 0,1 %. Les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués pendant 30 minutes avec du blotto 5% pour tous les anticorps primaires sauf pour l'anti-Apaf-1 et l'anti-actine pour lesquels on utilise la gélatine 2%. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-Apaf-1 avec une dilution de 1/200, anti-DAP3 avec une dilution de 1/250, anti-HLA-DR avec une dilution 1/1000, anti-actine avec une dilution 1/5000 et anti-P-24 avec une dilution 1/1000 pendant 16 à 18h à 4°C. Les membranes contenant les échantillons de cellules entières sont incubées avec l'anticorps primaire anti-HLA-DR avec une dilution 1/5000, pendant 1h à la

température pièce (TP). Après 3 lavages consécutifs de 5 minutes, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire anti-souris à une dilution 1/10 000, ou anti-chèvre (anti-actine) à une dilution 1/3500 dans une solution de TBS tween-20 0,1 % pendant 30 minutes à la TP. Après 3 lavages de 10 minutes, les membranes sont incubées 1 minute avec une solution de révélation.

3. CHAPITRE III : RÉSULTATS

3.1. Présence des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les différents types cellulaires utilisés pour produire du virus

Pour commencer nos recherches, nous avons voulu détecter la présence des protéines DAP3 et Apaf-1 dans plusieurs types cellulaires. De plus, nous avons voulu vérifier l'efficacité de détection des anticorps anti-DAP3 et anti-Apaf-1. Pour se faire, nous avons réalisé un immunobuvardage à partir de lysats de cellules HEK-293T, PBMCs, CDs et LTCD4 non-stimulées (Figure 16).

Les résultats présentés à la figure 16 révèlent la présence d'une protéine à 120 kDa (panneau A) et d'une protéine à 46 kDa (panneau B) correspondant respectivement à Apaf-1 et DAP3. Il est intéressant de noter que les quantités relatives de DAP3 et d'Apaf-1 varient selon le type cellulaire. En effet, la densité correspondant aux protéines Apaf-1 et DAP3 est plus intense chez les cellules HEK-293T et les CDs. Cependant, cette variation ne dépend pas de la quantité d'échantillon déposée. Effectivement, seulement 5×10^4 cellules ont été déposées dans les puits correspondants aux cellules HEK-293T et aux CDs, c'est-à-dire, 4 fois moins que pour les PBMCs et les LTCD4. Toutefois, tous les types cellulaires utilisés au laboratoire expriment les deux protéines.

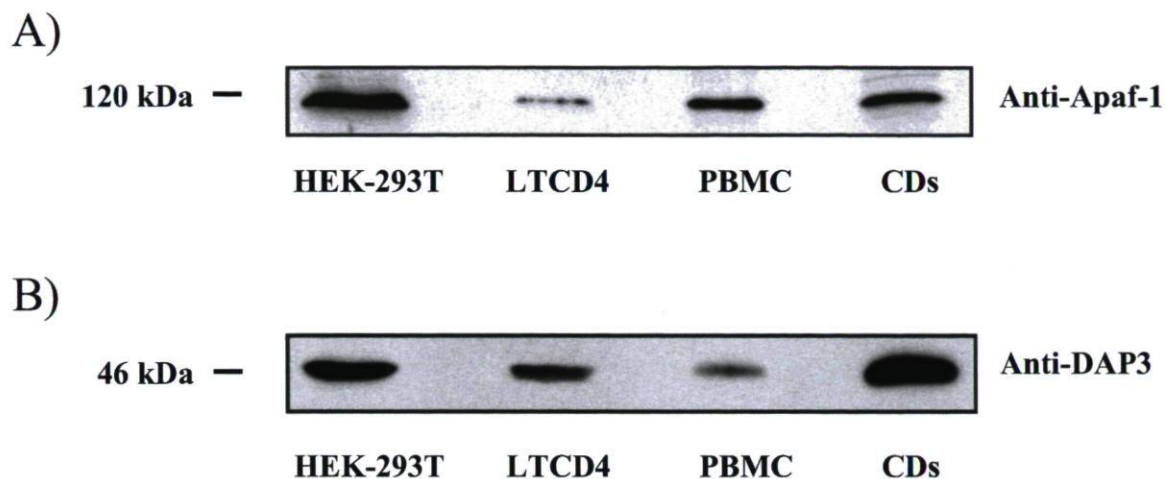


Figure 16 : Expression des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les HEK-293T, les LTCD4, les PBMCs et les CDs. 1×10^7 cellules/mL ont été lysées dans du tampon d'échantillon et les protéines ont été révélées avec les anticorps contre Apaf-1 tel qu'illustré au panneau A, et DAP3 (panneau B). Cependant, différentes quantités ont été déposées dans le puits. Pour les échantillons provenant des cellules HEK-239T et les CDs 5×10^4 cellules ont été déposées tandis que pour les LTCD4 et les PBMCs 2×10^5 cellules ont été déposées.

3.2. Les cellules HEK-293T

Après avoir observé la présence des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les cellules, nous avons commencé à travailler avec les exosomes. Le protocole de purification d'exosomes a été mis en place en utilisant les cellules HEK-293T. En effet, en laboratoire plusieurs préparations virales sont obtenues grâce à la transfection des cellules HEK-293T. De plus, comme nous l'avons vu dans la section 1.5, les résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont été réalisés sur les cellules HEK-293T. C'est-à-dire, l'observation de l'augmentation de la viabilité des LTCD4 à partir de préparations virales obtenues par la transfection des cellules HEK-293T et déplétées en exosomes (Figure 15).

En déposant différentes quantités en exosomes nous avons vérifié le seuil de détection des anticorps anti-DAP3 et anti-Apaf-1, et la présence des deux protéines, DAP-3 et Apaf-1, dans les exosomes provenant de HEK-293T. Pour se faire des échantillons de 20, 15, 10 et 5 μ l de lysats de cellules HEK-293T et des échantillons de 25, 20, 15, 10 μ l de lysat d'exosomes ont été déposés sur gel de polyacrylamide SDS page et immunobuvardés avec les anticorps anti-DAP3 et anti-Apaf-1 (Figure 17).

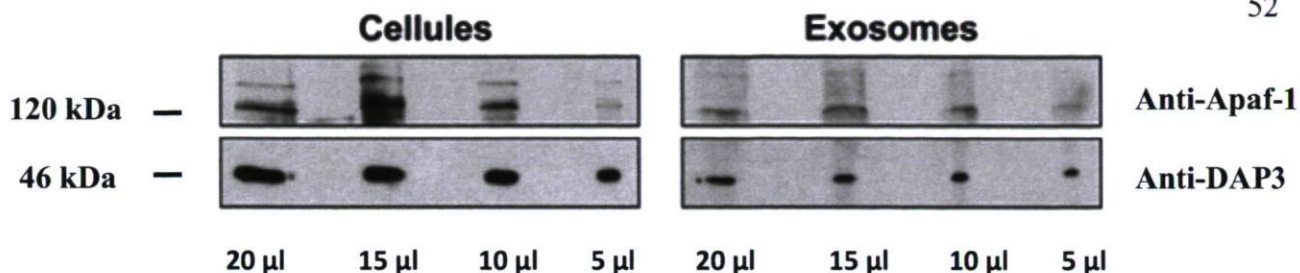


Figure 17 : Expression des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les cellules et présence dans les exosomes de cellules HEK-293T naïves. 5×10^6 de cellules HEK-293T sont incubées 48h à 37°C, le surnageant est récolté, filtré sur membrane de 0.22 μm et ultracentrifugé à 100 000 g pour la purification des exosomes. Un immunobuvardage est réalisé sur les échantillons avec les anticorps dirigés contre la protéine DAP3 et contre la protéine Apaf-1.

Ces résultats ont permis de constater la présence d'une bande immunoréactive à 46 kD, et à 120 kDa correspondant aux protéines DAP3 et Apaf-1 dans les échantillons de cellules et dans les échantillons d'exosomes. De plus, on remarque une variation du signal en fonction de la quantité d'échantillon déposée. Toutefois, la présence d'Apaf-1 dans les échantillons d'exosomes est difficile à détecter contrairement à celle de DAP3. Nous avons donc décidé de poursuivre les études avec la protéine DAP3.

Nous avons ensuite stimulé les cellules HEK-293T avec différentes molécules soit avec le H_2O_2 connu pour induire l'apoptose dans les cellules (216) ou encore avec l'ionophore de calcium (A23187) qui est connu pour augmenter la libération des exosomes (figure 18) (217-218).

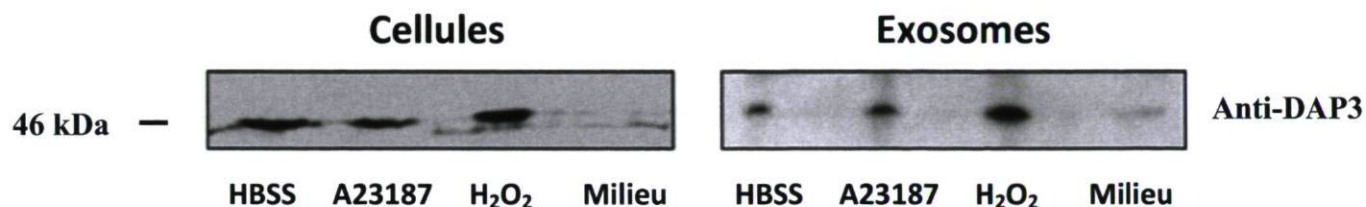


Figure 18 : Détection de la protéine DAP3 dans les cellules et dans les exosomes de cellules HEK-293T stimulées. 5×10^6 cellules HEK-293T sont stimulées avec l'ionophore de calcium A23187 à $1 \mu\text{M}$ final et du H_2O_2 à $30 \mu\text{M}$ final et incubées 48h à 37°C . Les surnageants sont récoltés, filtrés sur membrane de $0.22 \mu\text{m}$ et ultracentrifugés à $100\,000\text{ g}$ pour la purification des exosomes. Le culot est repris dans du PBS et du tampon d'échantillon (SB5x). Un immunobuvardage est réalisé sur les échantillons avec l'anticorps contre DAP3. On a déposé $5 \mu\text{l}$ /puits de lysats de cellules HEK-293T (figure de gauche) et $25 \mu\text{l}$ /puits de lysats d'exosomes (figure de droite).

Les résultats présentés à la figure 18 montrent que la quantité de DAP3 dans les cellules stimulées ne varie pas en fonction de la simulation, contrairement à nos échantillons d'exosomes. Il semble y avoir plus de DAP3 associée aux exosomes ou plus d'exosomes produit dans les cellules stimulées avec le H_2O_2 .

3.3. Les LTCD4⁺

Nous avons aussi vérifié la présence de DAP3 dans les exosomes provenant de LTCD4 par traitement avec le H₂O₂. En effet, lors de la primo-infection, une quantité assez importante de cellules sont en apoptose à la suite de l'infection par le VIH-1 (61, 186). En tenant compte des résultats précédents (Figure 18) nous avons repris le même protocole et stimulé nos LTCD4 avec du H₂O₂ (Figure 19). Un immunobuvardage avec les anticorps anti-DAP3 et anti-Apaf-1 a été fait sur les LTCD4 et les exosomes provenant d'un surnageant cellulaire de ces cellules.

Tel qu'attendu, la présence de DAP3 et d'Apaf-1 dans les LTCD4 est observée, de même que la présence du HLA-DR. Cependant, concernant les deux protéines impliquées dans l'apoptose, l'immunoblot n'a pas révélé leur présence dans les exosomes. Pour nous assurer que nous avons bien isolé les exosomes, nous avons fait un immunobuvardage avec un anti-HLA-DR, un marqueur utilisé dans notre laboratoire pour caractériser les exosomes. Les résultats nous montrent une bande à 34 kDa dans les cellules et dans les exosomes, ce qui correspond au poids moléculaire du HLA-DR. La purification des exosomes semble donc avoir bien fonctionné. De plus, la bande correspondant à la stimulation à l' H₂O₂ dans les exosomes est plus intense que la bande du témoin HBSS. Ces observations suggèrent que la stimulation avec le H₂O₂ a induit une augmentation de la libération en exosomes.

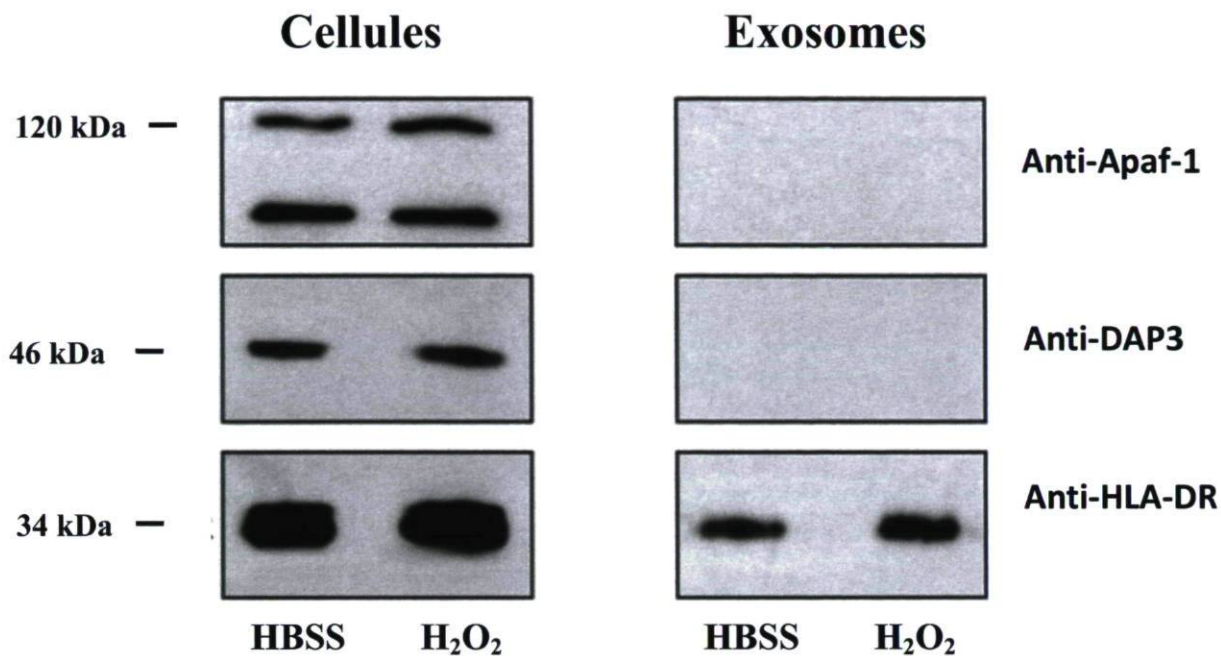


Figure 19 : Détection de la protéine DAP3 et Apaf-1 dans les cellules et les exosomes des lymphocytes T CD4⁺. 2×10^6 cellules/mL sont simulées avec du H₂O₂ à 15 μ M final et incubées 48h à 37°C, le surnageant est récolté, filtré sur membrane de 0.22 μ m et ultracentrifugé à 100 000 *g* pour la purification des exosomes. Un immunobuvardage est réalisé sur les échantillons avec l'anticorps contre DAP3, Apaf-1 et HLA-DR. Dépôt de 5 μ l/puits de lysats de cellules HEK-293T et 20 μ l/puits de lysats d'exosomes.

3.4. Les PBMCs et les CD4⁺ stimulées par les cristaux d'UMS

Puisque nous n'avons pas pu détecter la présence des protéines DAP3 et Apaf-1 dans les exosomes isolés à partir des LTCD4⁺, nous avons utilisé d'autres types cellulaires et les avons stimulés avec un puissant agent inflammatoire, les cristaux d'urate monosodique (UMS). Dans le laboratoire, les cristaux d'UMS sont connus pour provoquer la libération d'exosomes à partir des cellules mononucléées du sang, les PBMCs ou encore à partir des CD4⁺. Les résultats présentés à la figure 20 confirment par la révélation avec un anticorps dirigé contre le HLA-DR que les cristaux d'UMS provoquent la libération des exosomes.

On observe la présence d'une bande à 46 kDa correspondant à la protéine DAP3 que dans les échantillons de cellules. Aucune immunoréactivité n'a été décelée dans les préparations

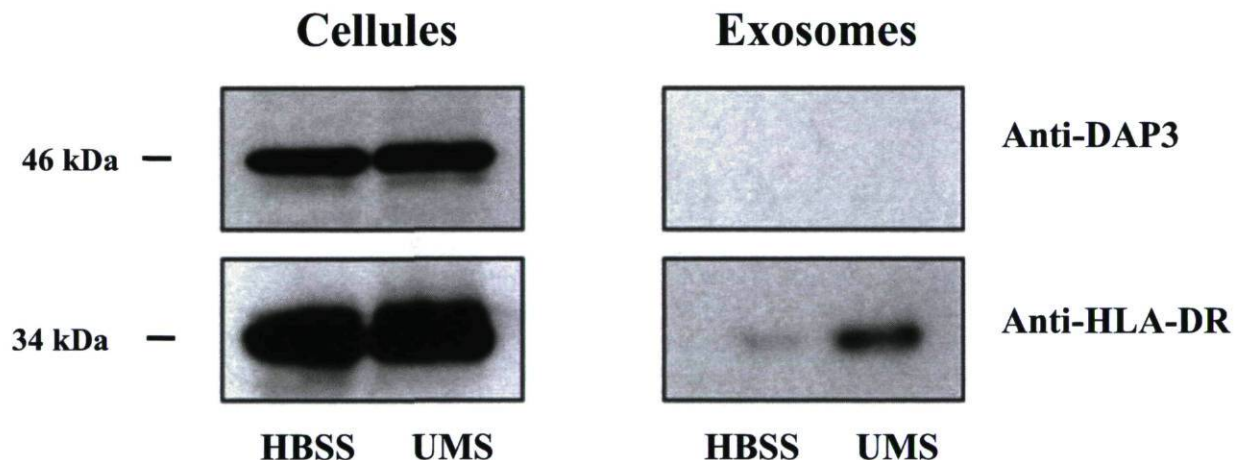


Figure 20 : Détection de la protéine DAP3 dans les PBMCs stimulées avec les cristaux d'UMS. 0.5×10^6 cellules/mL sont stimulées avec des cristaux d'UMS à 0.3 mg/mL final ou le même volume de HBSS et incubées 48h à 37°C. Le surnageant est recolté, filtré sur membrane de 0.22 μ m et ultracentrifugé à 100 000 g pour la purification des exosomes. Un immunobuvardage est réalisé sur les échantillons avec les anticorps contre DAP3. Dépôt de 5 μ l/puits de lysats de cellules HEK-293T et 25 μ l/puits de lysats d'exosomes.

d'exosomes. L'immunobuvardage avec l'anti-HLA-DR nous révèle une bande à 32 kDa dans les échantillons de cellules et d'exosomes. De plus, la bande immunoréactive dans les puits contenant l'échantillon d'exosomes purifiés à partir des cellules stimulées avec les cristaux d'UMS est plus forte que dans les échantillons d'exosomes contrôles. L'immunoblot avec l'anticorps anti-HLA-DR révèle une bande très forte mais d'égale intensité dans les cellules contrôles et stimulées. Ces observations suggèrent que la stimulation avec les cristaux d'UMS induit une augmentation de la production de vésicules en présence d'UMS. Cependant, la protéine DAP3 n'est pas décelée dans les échantillons d'exosomes.

Une fois que les protocoles de purification et d'immunobuvardage ont été mis au point, nous avons commencé à travailler avec les CDs stimulées avec les cristaux d'UMS.

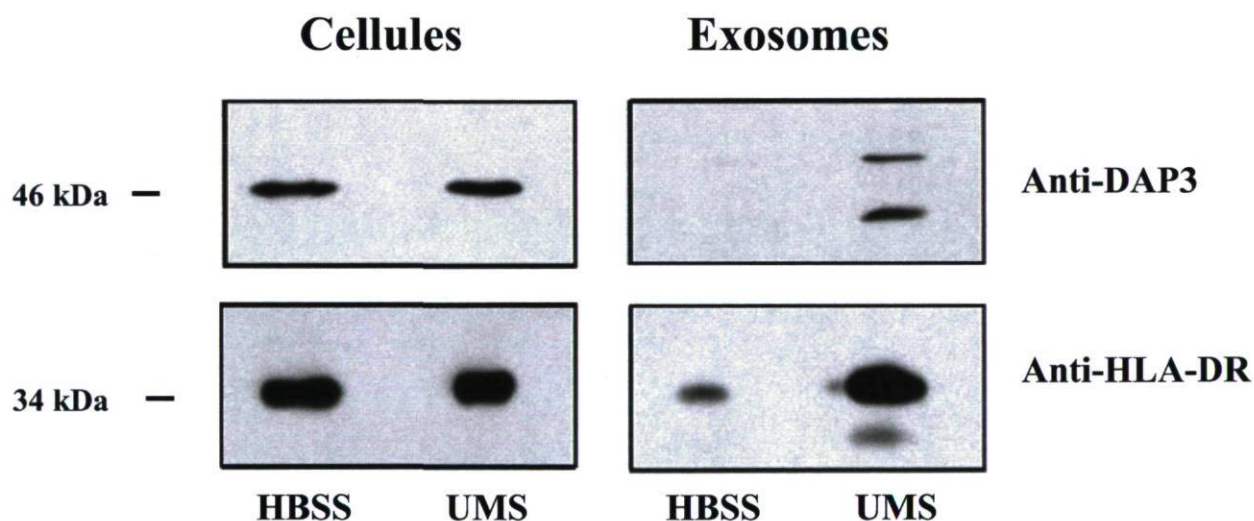


Figure 21 : Détection de la protéine DAP3 dans les cellules et les exosomes des CDs stimulées aux cristaux d'UMS. 5×10^5 cellules/mL sont stimulées avec à 0.3 mg/mL de cristaux d'UMS et incubées 48h à 37°C. Les surnageants sont récoltés, filtrés sur membrane de 0.22 μm et ultracentrifugés à 100 000 g pour la purification des exosomes. Le culot est repris dans du PBS et du tampon d'échantillon 5x. Un immunobuvardage est réalisé sur les échantillons avec les anticorps contre DAP3 et HLA-DR. Dépôt de 5 μl /puits de lysats de cellules HEK-293T (panneau de gauche) et 25 μl /puits de lysats d'exosomes (panneau de droite).

L'immunobuvardage des échantillons protéiques de CDs immatures avec l'anti DAP3 nous donne un signal constant dans toutes les conditions de stimulations (figure 21). À l'opposé, les résultats d'exosomes isolés à partir des CDs stimulées avec les cristaux d'UMS révèlent deux bandes dont une à 46kDa qui n'est pas présente dans les préparations d'exosomes provenant de cellules non-stimulées. L'immunobuvardage des CDs immatures avec l'anti-HLA-DR révèle une bande à 32 kDa. La stimulation avec les cristaux d'UMS semble diminuer le signal pour HLA-DR comparativement aux cellules contrôles. Un effet opposé est remarqué pour les préparations d'exosomes. C'est-à-dire que l'intensité de la bande à 32 kDa des exosomes provenant de cellules stimulées avec les cristaux d'UMS est beaucoup plus forte que celle des exosomes purifiés à partir du surnageant de cellules incubées avec le HBSS.

3.5. Les CDs stimulées avec du virus atténué (AT2)

Avec les résultats que nous avons obtenus précédemment, nous nous sommes penchés sur l'étude de la protéine DAP3, dans les CDs stimulées avec du virus atténué au 2,2'-dithiodipyridine (AT 2). Le virus atténué a été préparé par notre assistant de recherche. Pour se faire, nous avons mis en contact nos CDs soit avec un surnageant de HEK-293T traité à l'AT2 (MOCK) toute la nuit et ultracentrifugé, ou encore avec notre virus atténué traité de la même façon. Nous avons purifié nos exosomes pour ensuite réaliser un test de prolifération des LTCD4⁺ et un immunobuvardage avec un anti-DAP3. Pour évaluer et comparer la quantité en DAP3 dans nos échantillons, nous avons calculé un ratio en utilisant la quantité d'actine présente dans les mêmes échantillons (figure 22).

Nous avons réalisé le test de prolifération sur les LTCD4 provenant de quatre donneurs. Les LTCD4 ont été mises en contact avec 25 µl de nos échantillons d'exosomes provenant de CDs stimulées au VIH-1 atténué ou encore avec notre contrôle Mock (panneau A). On observe une légère diminution de la prolifération des LTCD4 naïfs et activés. Les LTCD4 actifs ont été activés avec les cytokines PHA-L et IL-2. L'effet contraire est observé lorsque les LTCD4 sont mises en contact avec les CDs (panneau B). En effet, on remarque

une augmentation de la viabilité des LTCD4. Cependant, ces résultats restent non significatifs car les diminutions ou les augmentations observées sont minimales.

Tel qu'illustré au panneau C, on observe une bande à 46 kDa, caractéristique de DAP3, et une bande à 42 kDa, caractéristique de l'actine dans les cellules, mais également dans les exosomes provenant des cellules stimulées avec le virus AT2 ou les cellules contrôles. Le calcul du ratio de la densité, DAP3/actine, nous a permis de comparer la quantité de protéines DAP3 dans chaque échantillon. Pour ce faire, nous avons utilisé trois mesures de densité pour chaque immunobuvardage dans chacune des conditions (panneau D). La mesure de la densité nous indique qu'il n'y a pas de différence significative au niveau du ratio DAP3/actine dans les préparations d'exosomes provenant de cellules stimulées avec le virus atténué ou des cellules contrôles. Nous avons utilisé l'anticorps contre la protéine P24 de la capsid du virus pour confirmer la présence de virions dans notre culot 100 000 *g* contenant aussi les exosomes. Comme attendu, deux bandes caractéristiques de la protéine P24 sont observées dans les puits contenant les échantillons de CDs mises en contact avec le VIH-1 et les exosomes correspondant (panneau C). Cependant, il serait pertinent de réaliser un gradient Optiprep pour séparer nos exosomes des particules virales et autres vésicules qui pourraient contaminer notre préparation d'exosomes. D'après les résultats obtenus, nous pouvons suggérer que la protéine DAP3 est présente dans les exosomes des CDs stimulées avec du virus atténué. Toutefois, elle reste difficile à déceler.

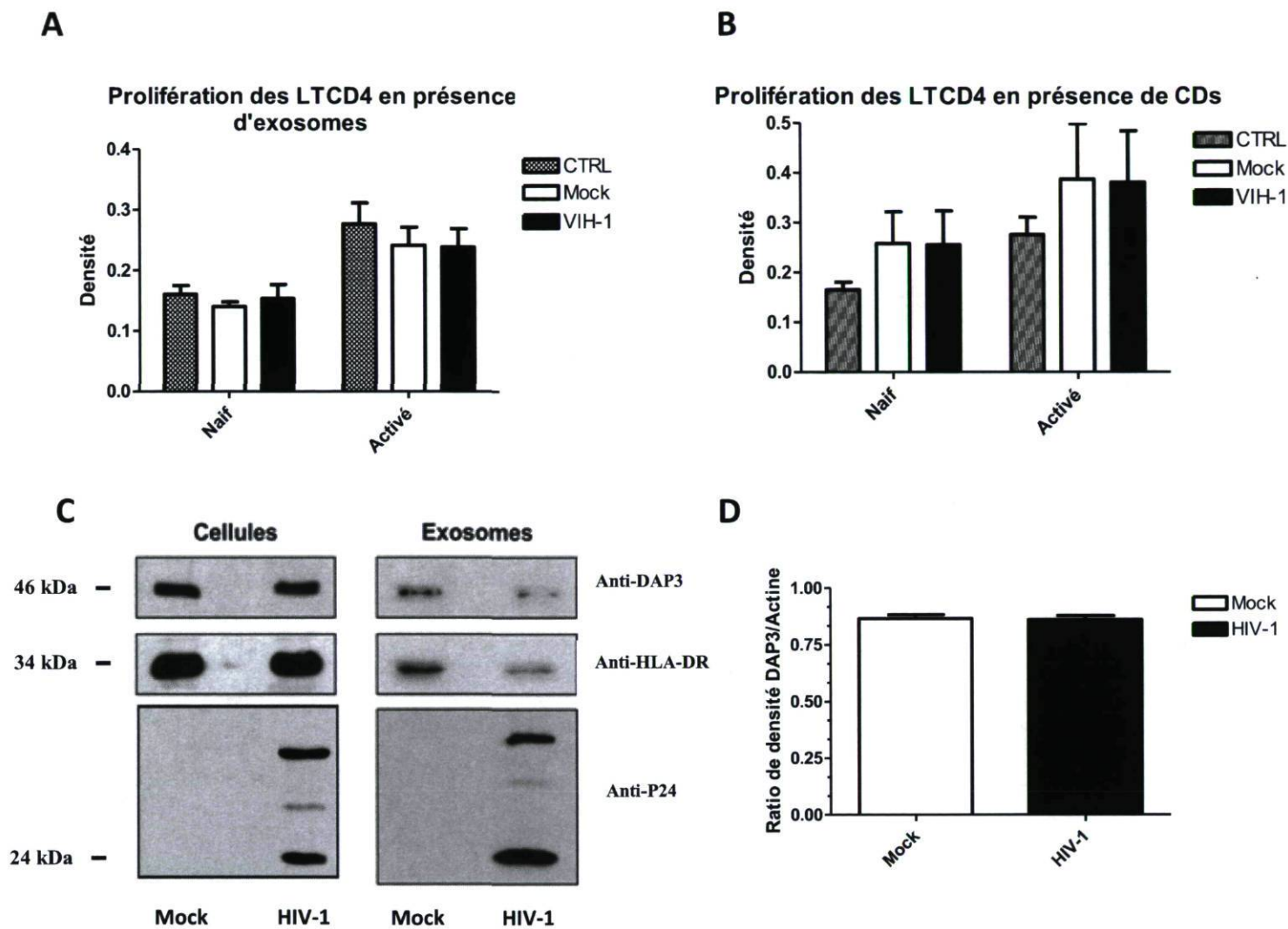


Figure 22 : Test de prolifération sur les LTCD4 avec des échantillons d'exosomes ou des CDs mises en contact avec du VIH-1 atténué. Les CDs ont été mises en contact avec du VIH-1 atténué pendant 48h à 37°C. Tel que décrit dans le matériel et méthode, le surnageant est prélevé et centrifugé à 10,000 *g* puis à 100,000 *g* pour isoler les exosomes. Le culot a été resuspendu dans 100 μ l de PBS. Puis 25 μ l de culot d'exosomes a été mis en contact avec 1×10^5 de LTCD4 (panneau A). Les CDs ont été resuspendues dans du RPMI 1640 à 33×10^3 cellules/mL et mises en contact avec 1×10^5 de LTCD4 (panneau B). Les cellules et les préparations d'exosomes ont été lysées dans du tampon d'échantillon et révélées avec les anticorps dirigés contre DAP3, P24 et actine (panneau C). Une densitométrie a été effectuée sur les échantillons d'exosomes pour contrôler la quantité relative de DAP3 via l'actine dans les deux préparations d'exosomes (panneau D).

3.6. Transfection des CDs avec l'ARN antisens anti-DAP3

Les premières expériences de transfections ont été réalisées sur des PBMCs pour mettre au point le protocole et pour tester nos ARN antisens. Les résultats obtenus n'ont pas été convaincants sur ces cellules (résultats non montrés). Nous avons aussi tenté une expérience en utilisant les CDs avec l'ARN antisens 2 (AS2) puis l'ARN sens (S) comme contrôle positif.

Les résultats ont révélé (panneau A, Figure 23) dans les échantillons transfectés avec l'ARN antisens 2 que la présence de la protéine DAP3 était diminuée à 5h et 24h. Le calcul du ratio de la densité DAP3/actine nous a permis de comparer la quantité de protéine DAP pour chaque condition de transfection (Figure 23, panneau B). Pour ce faire, nous avons utilisé trois mesures de chaque densité pour chaque immunobuvardage et chacune des conditions. On peut observer à 5h comme à 24h une légère diminution du ratio DAP3/actine dans les cellules transfectées avec l'ARN AS2, comparé à l'ARN S. Nous avons donc diminué l'expression de la protéine DAP3 dans les CDs mais cette diminution est très partielle.

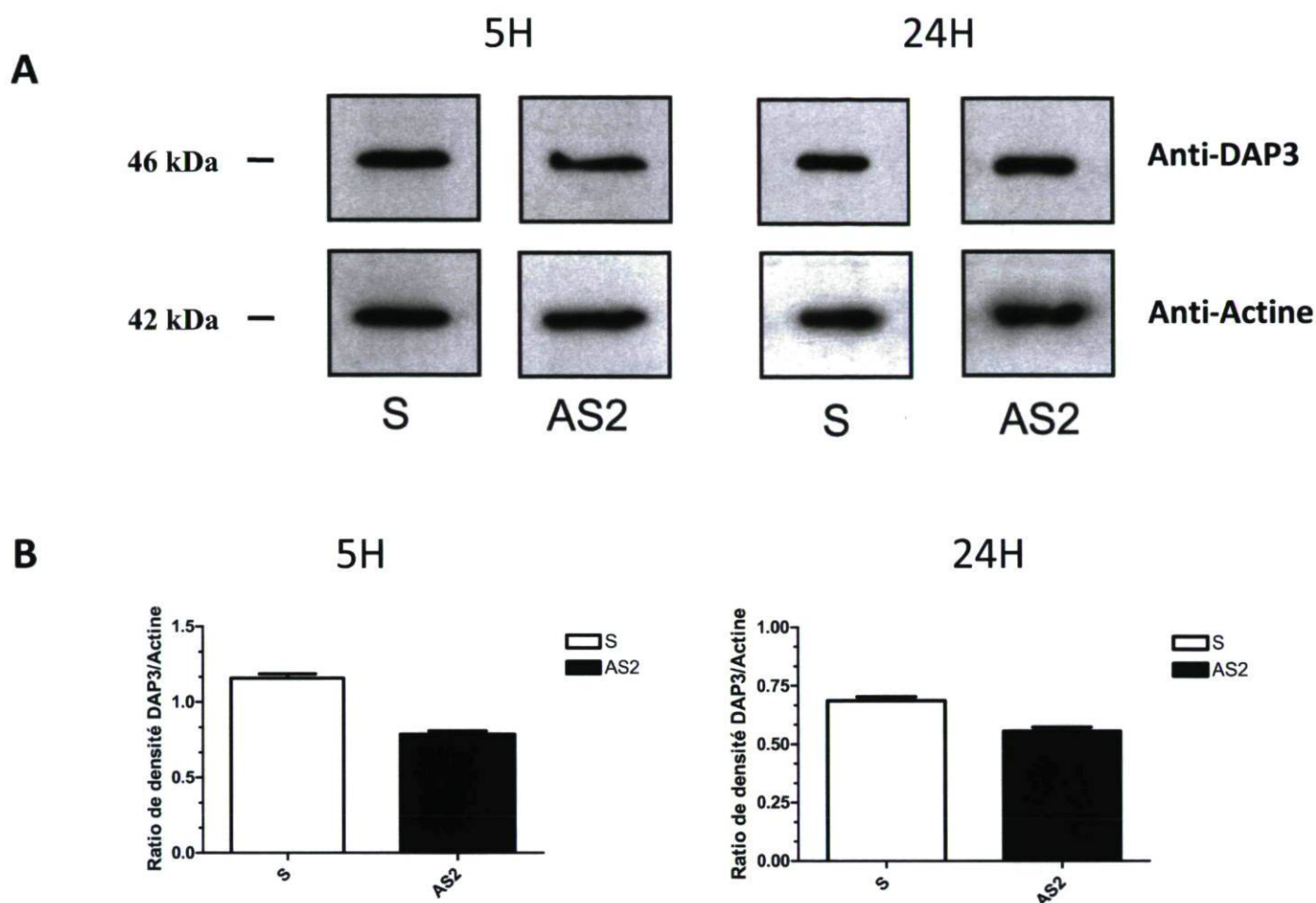


Figure 23 : Expression de DAP3 dans les CDs transfectées avec un ARN anti-sens anti-DAP3 à 5h et 24h. A) $3,75 \times 10^6$ cellules/mL sont incubées avec 200 pmol d'ARN anti-sens ou sens pendant 5 ou 24h à 37°C. Un immunobuvardage a été réalisé sur les échantillons avec un anticorps dirigés contre DAP3 et contre l'actine. B) La densité a été mesurée trois fois pour le calcul du ratio DAP3/actine à l'aide du logiciel Image J.

4. CHAPITRE IV – Discussion

Les CD4 sont connues comme étant des CPA professionnelles essentielles au bon fonctionnement du système immunitaire. En effet, leur aptitude à capturer et à présenter les antigènes module la réponse immunitaire innée et acquise. En plus de présenter les antigènes provenant de différents pathogènes, les CD4 participent aussi à leurs propagations dans l'organisme et à leurs transmissions au VIH-1. La pathogénèse du VIH-1 se caractérise principalement par une déplétion massive des LTCD4. Notamment, ce dernier exploite la voie de sécrétion des exosomes pour être transféré incognito aux LTCD4. L'implication des exosomes (Figure 23) dans la déplétion des LTCD4 lors de la primo infection est encore mal connue. Néanmoins, l'analyse protéomique de la purification en exosomes des CD4 mises en présence avec le VIH-1 révèle la présence des protéines apoptotiques DAP3 et Apaf-1. Nous nous sommes donc intéressés à savoir si leur présence dans les exosomes pourrait contribuer à la déplétion des LTCD4.

4.1. Présence de molécules proapoptotique dans les exosomes

Les résultats présentés à la figure 16 confirment que la protéine apoptotique DAP3 et Apaf-1 sont présentes dans les cellules HEK-293T, les PBMCs, les LTCD4 ainsi que dans les CD4. Toutefois, aucune donnée de la littérature ne montre que ces deux protéines pourraient se retrouver dans les exosomes. Alors quels seraient les mécanismes possibles expliquant la présence de DAP3 et APAF-1 dans les nanovésicules puisqu'elles sont principalement localisées dans le cytosol DAP3 et Apaf-1 pourraient se retrouver dans les exosomes lors du processus normal de tri cellulaire c'est-à-dire lors de la dégradation des protéines menant directement à l'endosome tardif (83, 219). Il est aussi possible que DAP3 se retrouve dans les corps multivésiculaires lorsque le ligand de mort TRAIL est internalisé et stocké dans les endosomes tardifs (220). Pour finir, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'état d'activation de la cellule est un facteur tout aussi important favorisant ou diminuant l'expression de certaines protéines (132).

4.2. La protéine Apaf-1 dans les cellules et les exosomes

Dans les premiers résultats obtenus par immunobuvardages des cellules HEK-293T et LTCD4, stimulés ou non, nous avons observé, comme attendu, la présence de la protéine Apaf-1 (figures 16 et 20). Cependant, l'anti-Apaf-1 reconnaît plusieurs bandes qui semblent spécifiques dans les cellules HEK-293T ainsi que dans les LTCD4. Nous pouvons expliquer cette observation par le fait que plusieurs isoformes de la protéine Apaf-1 sont rapportés dans la littérature et les banques de données, soit les isoformes 1, 4, 5 et 6. Les isoformes 4, 5 et 6 sont des protéines de 1205, 1171 et 338 aa. L'isoforme 1 demeure toutefois le plus étudié. Il est constitué de 1248 aa. Comme on peut le constater, tous les isoformes se différencient seulement par quelques séquences en acides aminés (aa). En effet, tous ont 98% de similarités. La séquence spécifique contre laquelle notre anticorps monoclonal est dirigé, n'a pas été spécifiée. Donc, il se peut que se soit une séquence consensus commune à tous les isoformes d'Apaf-1.

Comme pour nos échantillons de cellules, plusieurs bandes sont reconnues dans les échantillons d'exosomes isolés des cellules HEK-293T (figure 17). Toutefois, la présence de la protéine Apaf-1 est difficilement détectable ou est totalement absente, comme dans les préparations d'exosomes provenant des LTCD4 (figure 19). Ces résultats suggèrent que la protéine Apaf-1 est très peu abondante dans les exosomes provenant des cellules HEK-293T et des LTCD4 naïfs ou stimulés. Cependant, des résultats trouvés au sein du laboratoire montrent que la protéine Apaf-1 se retrouve dans les exosomes de CDs matures. Il se pourrait qu'au lieu d'être recyclée dans les exosomes, la protéine Apaf-1 soit directement transportée aux lysosomes pour y être dégradée. En effet, certaines protéines au lieu d'être recrutées à l'endosome tardif, vont être transportées au lysosome pour y subir une dégradation complète (77). En absence de stimuli appropriés, il est aussi possible qu'Apaf-1 ne soit pas recrutée dans les endosomes tardifs. Des immunoblots complémentaires de purification d'exosomes provenant de CDs matures ou encore un gradient Optiprep permettraient de confirmer la présence d'Apaf-1 dans les exosomes.

4.3. La protéine DAP3 dans les cellules et les exosomes.

Tel que mentionné précédemment, des résultats préliminaires ont permis de montrer que la viabilité des LTCD4 est augmentée si les préparations virales produites sur les HEK-293T étaient déplétées en exosomes. Les cellules HEK-293T nous semblaient donc être un bon modèle pour commencer nos recherches afin de détecter la présence de la protéine DAP3 dans les exosomes. Comme le montre la figure 17, la protéine DAP3 est présente dans les exosomes isolés à partir des cellules HEK-293T non-stimulées.

La purification d'exosomes provenant de cellules HEK-293T stimulées avec le H_2O_2 révèle une quantité augmentée de DAP3 contrairement à la stimulation avec l'ionophore ou encore à notre contrôle HBSS (figure 18). Toutefois, on remarque que la stimulation avec l'A23187 donne un signal plus fort que pour le contrôle HBSS. En effet, l'A23187 est connu pour augmenter la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire (217-218). Le H_2O_2 quant à lui induit l'apoptose (216). Il a déjà été montré que la composition protéique des exosomes dépend du stimulus et de l'état d'activation de la cellule. Pour expliquer nos résultats, nous proposons que l'induction de l'apoptose augmente la libération des exosomes dans le milieu extra cellulaire ainsi que des vésicules apoptotiques. Cependant, les échantillons purifiés d'exosomes peuvent être contaminés en vésicules apoptotiques. Pour distinguer les vésicules apoptotiques des exosomes, il aurait été pertinent de faire un gradient de vélocité qui aurait permis de séparer les exosomes des vésicules apoptotiques et de confirmer la présence de DAP3 dans les exosomes. Toutefois, nous avons réalisé différentes étapes permettant l'élimination, en grande partie, des autres types de vésicules. Tout d'abord par centrifugation à 700 **g** éliminant les cellules et les débris cellulaires. Puis, avant de centrifuger le surnageant à 100 000 **g** nous avons filtré nos échantillons avec un filtre 0,22 μ ce qui élimine les microvésicules de 200 nm et plus. Pour conclure, les résultats obtenus après la stimulation des cellules HEK-293T avec l'A23187 et le H_2O_2 révèlent une quantité augmentée en DAP3. Cependant, la stimulation avec le H_2O_2 semble augmenter le signal pour DAP3 comparativement à l'A23187 et à l'HBSS.

Le modèle des cellules HEK-293T reste un modèle limitant. Par exemple, nous ne pouvons pas réaliser d'immunoblots avec l'anticorps dirigé contre l'HLA-DR pour confirmer la présence des exosomes puisque ces cellules ne l'expriment pas. Nous avons donc commencé à travailler sur les LTCD4 qui sont les principales cellules produisant le virus lors d'une infection. Il est connu que l'infection par le VIH-1 s'accompagne d'un stress oxydatif à la suite d'un déficit en antioxydants associé à une augmentation de la production des formes réactives de l'oxygène (221-222). Nous avons donc voulu voir si la stimulation avec le H_2O_2 , une forme réactive de l'oxygène produite par les cellules infectées, permettrait de recruter la protéine DAP3 dans les exosomes. Les résultats de l'expérience illustrés à la figure 19 montrent comme précédemment que la protéine DAP3 est présente dans les cellules mais que sa présence n'a pu être détectée dans les préparations d'exosomes. Nous avons fait l'immunobuvardage avec l'anti-HLA-DR qui nous a permis de confirmer que nous étions en présence d'exosomes. De plus, nous avons pu remarquer que la quantité en exosomes était légèrement augmentée avec le stimulus H_2O_2 . Nous pouvons donc spéculer que le H_2O_2 favorise la libération des exosomes, cependant ces résultats restent à confirmer avec le gradient de vélocité. Étant donné que DAP3 est aussi une protéine de la sous-unité ribosomale 28S, il a été reporté dans la littérature que la stimulation avec un agent oxydant, tel que le H_2O_2 favorise son accumulation dans la mitochondrie et par conséquent diminuant son expression dans le cytoplasme (209). Il aurait été utile de savoir si une telle réponse est spécifique à la protéine DAP3. Pour tester cette possibilité, il aurait été pertinent de faire une analyse par immunoblot de chaque compartiment cellulaire, dont entre autres, le cytoplasme, la mitochondrie ou encore dans les corps multivésiculaires. Enfin, l'utilisation de la microscopie confocale pour observer la translocation de la protéine DAP3 dans le corps multivésiculaire lors de la stimulation avec H_2O_2 aurait aussi pu être envisagée.

N'ayant pas obtenu de résultats concluants avec les LTCD4, nous nous sommes intéressés aux cellules primaires PBMCs. Une fois le protocole mis en place, nous avons étendu nos travaux aux CDs en appliquant les mêmes conditions et en utilisant un agoniste connu pour provoquer la libération d'exosomes. En effet, d'après des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire, la stimulation des PBMCs avec les cristaux d'UMS, provoque la

libération d'exosomes. Les cristaux d'UMS sont connus comme étant l'agent étiologique de la goutte et aussi comme étant un puissant agent pro-inflammatoire (223). Il a été montré que la stimulation avec les cristaux d'UMS induit la dégranulation des neutrophiles (224-226), l'activation et la maturation des CD8 (227), et peut-être même perçue comme un signal de danger par le système immunitaire (227).

Les résultats de la stimulation des cellules PBMCs et des CD8 avec les cristaux d'UMS illustrés aux figures 20 et 21 montrent que la protéine DAP3 est présente dans les deux types cellulaires. La stimulation n'affecte pas les niveaux d'expression de DAP3 dans ces cellules. L'immunobuvardage des exosomes avec l'anti-HLA-DR indique que la stimulation avec les cristaux d'UMS augmente la libération d'exosomes dans les deux types cellulaires. Cependant, la présence de la protéine DAP3 dans les exosomes est observée seulement dans les échantillons de CD8 stimulés aux cristaux d'UMS. De plus, on observe deux bandes dans les échantillons d'exosomes dont une correspond à la protéine DAP3. La deuxième bande pourrait correspondre à la protéine DAP3 modifiée post-transcriptionnellement par une protéine SUMO. Les protéines SUMO sont connues pour se lier de façons covalentes ou non à différentes protéines, ce processus se nomme la SUMOylation (228). Cependant, il faudrait chercher si DAP3 possède des sites de sumoylation et si elle est capable de subir des modifications post-transcriptionnelles de façon à lier les protéines SUMO.

Nous observons par immunobuvardages la présence de HLA-DR qui est plus forte dans les échantillons stimulés par les cristaux d'UMS, indiquant que nous avons bien isolé les exosomes et que la stimulation aux cristaux d'UMS a provoqué une augmentation de la libération d'exosomes par les PBMCs. Cependant, la présence de DAP3 dans ces échantillons n'a pas été détectée. Toutefois, des nouveaux résultats obtenus au sein du laboratoire montrent que la protéine DAP3 est présente dans les exosomes purifiés à partir de PBMCs (résultats non montrés). Nos résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation d'une solution de révélation moins sensible qui ne nous a pas permis de détecter la protéine DAP3.

4.4. La protéine DAP3 dans les exosomes des CDs stimulées avec le VIH-1 atténué

Une fois que tous les outils ont été mis en place, nous avons commencé à travailler sur le VIH-1. Afin de pouvoir travailler dans l'enceinte du laboratoire de niveau P2, l'infectivité du virus a été atténuée avec du 2,2'-dithiopyridine (AT2). Le protocole est décrit dans le chapitre III. Après quatre tentatives de stimulations des CDs avec le VIH-1 AT2, nous avons pu déceler la protéine DAP3 dans les exosomes (figure 22, panneau A). Cependant, plusieurs paramètres ne coïncident pas avec l'hypothèse et les résultats préliminaires. Pour commencer, l'immunoblot avec l'anti-actine révèle que la quantité d'exosomes, isolée à partir des CDs stimulées avec VIH-1 AT2 est inférieure au Mock AT2. Bien que peu significative, la densitométrie réalisée sur ces mêmes échantillons confirme ces observations. La stimulation des CDs avec le VIH-1 AT 2 aurait dû augmenter la libération des exosomes des CDs. Cependant, étant donné que nous avons commencé à travailler avec un virus non-infectieux, il se peut qu'une réplication virale productive soit une étape nécessaire à l'augmentation de la libération des exosomes par les CDs, ou encore, au recrutement de la protéine DAP3 au niveau des endosomes tardifs. Ces résultats peuvent aussi s'expliquer par le fait que le virus atténué pourrait induire la nécrose cellulaire, diminuant considérablement la libération des exosomes et l'expression de la protéine DAP3, processus actif seulement chez les cellules viables.

La nécessité d'une réplication virale productive peut aussi expliquer les résultats des tests de prolifération. Même si des augmentations ou des diminutions de la prolifération des LTCD4 est observée, les résultats restent peu significatifs. En effet, comme nous pouvons le constater à la figure 22, panneau A, nos échantillons d'exosomes contrôles (MOCK) diminuent la prolifération des LTCD4 naïfs plus que nos exosomes purifiés à partir de CDs mises en contact avec le virus. La co-culture des LTCD4 avec les CDs mises en contact avec le VIH-1 atténué ou non augmente la prolifération des LTCD4 mais donne la même intensité de réponse (panneau B). Nous ne pouvons rien conclure sur les résultats de prolifération que nous avons obtenus. Cependant, il faudrait mettre en place le test de mesure de l'apoptose des cellules pour voir l'impact des exosomes et de CDs sur la

viabilité des LTCD4. En effet, le test *ApoStat Intracellular Caspase Detection* est destiné à identifier et à quantifier l'activité des caspases dans les cellules en apoptose.

4.5. Diminution de l'expression de la protéine DAP3

Pour finir, nous avons transfecté des CDs avec un ARN anti-sens anti-DAP3 (figure 23). En calculant le ratio de densité DAP3/actine, nous constatons une diminution de la quantité en protéine dans les cellules transfectées avec l'ARN AS2. Une diminution de l'expression de la protéine DAP3 induite par l'ARN AS2 dans les CDs est observée mais reste marginale. Cette approche sera utile afin de diminuer la quantité de DAP3 dans les cellules et de vérifier l'impact des exosomes provenant des cellules depletées en DAP3 sur la viabilité des LTCD4 par exemple. Toutefois, pour améliorer la diminution de l'expression de la protéine DAP3 nous pouvons utiliser des siRNA, qui ont pour but d'inhiber l'expression des protéines cibles, ou encore des ARN anti-sens avec une séquence en oligonucléotides différente.

5. CHAPITRE V – Conclusions et perspectives

En conclusion, les présents travaux ont mis en évidence la présence des protéines apoptotiques DAP3 et Apaf-1 dans les exosomes de différents types cellulaires dont les HEK-293T et les CDs en réponse soit à la stimulation avec le H₂O₂ ou avec les cristaux d'UMS. Cette étude confirme, également, l'analyse protéomique montrant que la protéine DAP3 se retrouve dans les exosomes isolés des CDs mises en contact avec le VIH-1 ou non (figure 22).

Cependant, de nombreuses investigations restent à faire. Pour commencer, il faudrait reprendre le protocole sur des CDs et les mettre en présence avec le VIH-1 non-atténué pour déterminer si une infection productive est nécessaire pour observer la présence de la protéine DAP3 et Apaf-1 dans les échantillons d'exosomes provenant de ces cellules. Un autre point important à considérer dans cette étude est l'état d'activation des CDs. En effet, lors de la primo infection et de la capture des virions, les CDs sont immatures. Toutefois, c'est au stade mature qu'elles transfèrent le virus aux LTCD4. Il serait donc intéressant d'induire l'activation et la maturation des CDs avant de purifier et d'analyser nos échantillons d'exosomes produits en présence du VIH-1.

D'autre part, il serait important de mettre en place le protocole de prolifération des LTCD4 avec les échantillons d'exosomes provenant des CDs mises en contact avec le VIH-1. En modulant l'expression de la protéine DAP3 dans les CDs par les ARN anti-sens, nous pourrions analyser si cette dernière a un impact sur la viabilité des LTCD4.

Finalement, peu d'informations sont disponibles sur la présence de DAP3 et d'Apaf-1 dans les exosomes. Sont-elles présentes à la surface des vésicules? Ou à l'intérieur? Des recherches supplémentaires dont, entre autres, des expériences éliminant les protéines à la surface des exosomes par un traitement à la trypsine pourraient être

envisagées. Ceci permettrait de compléter notre compréhension des différents rôles des exosomes et de leur contenu protéique sur la viabilité des LTCD4.

Bibliographie

1. Egeler RM, Zantinga AR, Coppes MJ. 1994. Paul Langerhans Jr. (1847-1888): a short life, yet two eponymic legacies. *Med Pediatr Oncol* 22: 129-32
2. Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-62
3. van Furth R. 1980. The mononuclear phagocyte system. *Verh Dtsch Ges Pathol* 64: 1-11
4. Nussenzweig MC, Steinman RM, Gutchinov B, Cohn ZA. 1980. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 152: 1070-84
5. Zinkernagel RM, Doherty PC. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701-2
6. Steinman RM, Witmer MD. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5132-6
7. Nossal GJ, Abbot A, Mitchell J, Lummus Z. 1968. Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. *J Exp Med* 127: 277-90
8. Humphrey JH, Frank MM. 1967. The localization of non-microbial antigens in the draining lymph nodes of tolerant, normal and primed rabbits. *Immunology* 13: 87-100
9. Fu YX, Chaplin DD. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 17: 399-433
10. Imal Y, Yamakawa M. 1996. Morphology, function and pathology of follicular dendritic cells. *Pathol Int* 46: 807-33
11. Tew JG, Thorbecke GJ, Steinman RM. 1982. Dendritic cells in the immune response: characteristics and recommended nomenclature (A report from the Reticuloendothelial Society Committee on Nomenclature). *J Reticuloendothel Soc* 31: 371-80
12. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185: 1101-11
13. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82: 487-93
14. Sorg RV, Kogler G, Wernet P. 1999. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* 93: 2302-7
15. Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, Briere F. 2001. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 107: 835-44

16. Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. 2010. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115: 5366-75
17. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5: 919-23
18. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192: 219-26
19. Svensson H, Cederblad B, Lindahl M, Alm G. 1996. Stimulation of natural interferon-alpha/beta-producing cells by *Staphylococcus aureus*. *J Interferon Cytokine Res* 16: 7-16
20. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 119: 1096-102
21. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S, Hartmann G. 2003. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63: 6478-87
22. Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S, Ikehara S. 1999. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163: 1409-19
23. Steinman RM, Pack M, Inaba K. 1997. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 156: 25-37
24. Steinman RM, Nussenzweig MC. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 351-8
25. Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* 257: 383-7
26. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300: 1295-7
27. Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stossel H, Romani N, Piatak M, Jr., Lifson JD, Pope M, Cunningham AL. 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103: 2170-9
28. Maisnier-Patin K, Crabe S, Breton G, Dupuy FP, Yassine-Diab B, Sekaly RP. 2007. [mRNA-transfected dendritic cells: a promising strategy in immunotherapy]. *Med Sci (Paris)* 23: 279-84
29. Zal T, Volkmann A, Stockinger B. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 180: 2089-99
30. Sallusto F, Lanzavecchia A. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 189: 611-4

31. de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C. 1998. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 160: 1666-76
32. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. 1997. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90: 1458-70
33. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188: 373-86
34. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28: 2760-9
35. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. 1999. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 66: 1-9
36. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 272: 13803-9
37. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811
38. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Goulder PJ, Walker BD. 2000. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 407: 523-6
39. Haase AT. 1999. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 17: 625-56
40. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362: 355-8
41. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. 1998. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 128: 613-20
42. Cooper DA, Gold J, Maclean P, Donovan B, Finlayson R, Barnes TG, Michelmore HM, Brooke P, Penny R. 1985. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1: 537-40
43. Vanhems P, Beaulieu R. 1997. Primary infection by type 1 human immunodeficiency virus: diagnosis and prognosis. *Postgrad Med J* 73: 403-8
44. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271: 1582-6
45. Lang W, Perkins H, Anderson RE, Royce R, Jewell N, Winkelstein W, Jr. 1989. Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2: 63-9

46. Phillips AN, Lee CA, Elford J, Janossy G, Timms A, Bofill M, Kernoff PB. 1991. Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS. *Lancet* 337: 389-92
47. Kamp W, Berk MB, Visser CJ, Nottet HS. 2000. Mechanisms of HIV-1 to escape from the host immune surveillance. *Eur J Clin Invest* 30: 740-6
48. McMichael A. 1998. T cell responses and viral escape. *Cell* 93: 673-6
49. Ioannidis J, Wilkinson D. 2003. HIV: opportunistic infections. *Clin Evid*: 795-816
50. Bomsel M. 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 3: 42-7
51. Pope M, Haase AT. 2003. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* 9: 847-52
52. Bomsel M, David V. 2002. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nat Med* 8: 114-6
53. Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, Fennelly G, Dobroszycki J, Palumbo P, Wiznia A, Grant RM, Bhardwaj N, Rosenberg MG, Nixon DF. 2002. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 76: 7528-34
54. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, Reinhart TA, Rogan M, Cavert W, Miller CJ, Veazey RS, Notermans D, Little S, Danner SA, Richman DD, Havlir D, Wong J, Jordan HL, Schacker TW, Racz P, Tenner-Racz K, Letvin NL, Wolinsky S, Haase AT. 1999. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* 286: 1353-7
55. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361-7
56. Lee B, Leslie G, Soilleux E, O'Doherty U, Baik S, Levroney E, Flummerfelt K, Swiggard W, Coleman N, Malim M, Doms RW. 2001. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol* 75: 12028-38
57. Lambert AA, Gilbert C, Richard M, Beaulieu AD, Tremblay MJ. 2008. 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* 112: 1299-307
58. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-97
59. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16: 135-44
60. Fox CH, Tenner-Racz K, Racz P, Firpo A, Pizzo PA, Fauci AS. 1991. Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Infect Dis* 164: 1051-7
61. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749-59

62. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2001. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410: 980-7
63. Ameisen JC, Capron A. 1991. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 12: 102-5
64. Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, Haase AT. 2002. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest* 110: 1133-9
65. Ott M, Emiliani S, Van Lint C, Herbein G, Lovett J, Chirmule N, McCloskey T, Pahwa S, Verdin E. 1997. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science* 275: 1481-5
66. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. 1994. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 68: 8056-63
67. Tsuji T, Nibu R, Iwai K, Kanegane H, Yachie A, Seki H, Miyawaki T, Taniguchi N. 1994. Efficient induction of immunoglobulin production in neonatal naive B cells by memory CD4+ T cell subset expressing homing receptor L-selectin. *J Immunol* 152: 4417-24
68. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188: 2205-13
69. Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O. 2006. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* 108: 1643-51
70. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demareux N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168: 2118-26
71. Burleigh L, Lozach PY, Schiffer C, Staropoli I, Pezo V, Porrot F, Canque B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. 2006. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* 80: 2949-57
72. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. 2005. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093-7
73. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borrás FE, Puertas MC, Connor JH, Fernandez-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J. 2009. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113: 2732-41
74. Pan BT, Blostein R, Johnstone RM. 1983. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. *Biochem J* 210: 37-47
75. Pan BT, Johnstone RM. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33: 967-78

76. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101: 942-8
77. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. 2000. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1515-24
78. Hurley JH. 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* 20: 4-11
79. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13368-73
80. Babst M. 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic* 6: 2-9
81. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458: 172-7
82. Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Faure J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J. 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303: 531-4
83. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89: 205-12
84. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319: 1244-7
85. White IJ, Bailey LM, Aghakhani MR, Moss SE, Futter CE. 2006. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J* 25: 1-12
86. Gauvreau ME, Cote MH, Bourgeois-Daigneault MC, Rivard LD, Xiu F, Brunet A, Shaw A, Steimle V, Thibodeau J. 2009. Sorting of MHC class II molecules into exosomes through a ubiquitin-independent pathway. *Traffic* 10: 1518-27
87. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73:1907-20
88. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3: 321-30
89. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12: 19-30; sup pp 1-13
90. Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 513-25
91. Tsuboi T, Fukuda M. 2006. The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1.syntaxin-1a complex. *Mol Biol Cell* 17: 2101-12
92. Pfeffer SR. Two Rabs for exosome release. 2010. *Nat Cell Biol* 12: 3-4
93. Kuroda TS, Fukuda M, Ariga H, Mikoshiba K. 2002. The Slp homology domain of synaptotagmin-like proteins 1-4 and Slac2 functions as a novel Rab27A binding domain. *J Biol Chem* 277: 9212-8
94. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and

- exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94: 3791-9
95. Poutsika DD, Schroder EW, Taylor DD, Levy EM, Black PH. 1985. Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of Ia antigen by macrophages. *J Immunol* 134: 138-44
 96. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. 2006. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol* 169: 2127-36
 97. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19: 43-51
 98. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. 2005. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20: 22-7
 99. Dolo V, Ginestra A, Gherzi G, Nagase H, Vittorelli ML. 1994. Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities. *J Submicrosc Cytol Pathol* 26: 173-80
 100. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. 2002. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 30: 450-9
 101. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M. 2007. Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett* 113: 76-82
 102. Dolo V, Adobati E, Canevari S, Picone MA, Vittorelli ML. 1995. Membrane vesicles shed into the extracellular medium by human breast carcinoma cells carry tumor-associated surface antigens. *Clin Exp Metastasis* 13: 277-86
 103. Zucker S, Wieman JM, Lysik RM, Wilkie DP, Ramamurthy N, Lane B. 1987. Metastatic mouse melanoma cells release collagen-gelatin degrading metalloproteinases as components of shed membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 924: 225-37
 104. Curtiss M, Colgan J. 2007. The role of the T-cell costimulatory molecule Tim-1 in the immune response. *Immunol Res* 39: 52-61
 105. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. 2007. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450: 435-9
 106. Eken C, Gasser O, Zenhausern G, Oehri I, Hess C, Schifferli JA. 2008. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 180: 817-24
 107. Stein JM, Luzio JP. 1991. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J* 274 (Pt 2): 381-6
 108. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM. 1994. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 153: 3245-55
 109. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. 2010. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin Exp Immunol*
 110. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. 2001. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances

- expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 158: 277-87
111. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. 2005. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol* 27: 375-87
 112. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. 2003. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res* 285: 243-57
 113. Mobius W, Ohno-Iwashita Y, van Donselaar EG, Oorschot VM, Shimada Y, Fujimoto T, Heijnen HF, Geuze HJ, Slot JW. 2002. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem* 50: 43-55
 114. Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. 1999. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 163: 4564-73
 115. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, Freyssinet JM. 1997. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 99: 1546-54
 116. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 179: 1317-30
 117. Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15
 118. They C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166: 7309-18
 119. Emlen W, Niebur J, Kadera R. 1994. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 152: 3685-92
 120. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-68
 121. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-9
 122. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE. 2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10592-7
 123. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M. 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162: 443-55
 124. Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H. 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3: 718-29
 125. Jouvenet N, Neil SJ, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD. 2006. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* 4: e435
 126. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. 2003. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* 278: 52347-54

127. Thery C, Ostrowski M, Segura E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 581-93
128. Ahn J, Johnstone RM. 1993. Origin of a soluble truncated transferrin receptor. *Blood* 81: 2442-51
129. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, Hager HD, Abdel-Bakky MS, Gutwein P, Altevogt P. 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int* 72: 1095-102
130. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-72
131. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273: 20121-7
132. Segura E, Amigorena S, Thery C. 2005. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis* 35: 89-93
133. Pols MS, Klumperman J. 2009. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 315: 1584-92
134. Nishiuchi R, Sanzen N, Nada S, Sumida Y, Wada Y, Okada M, Takagi J, Hasegawa H, Sekiguchi K. 2005. Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1939-44
135. Skubitz KM, Campbell KD, Iida J, Skubitz AP. 1996. CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J Immunol* 157: 3617-26
136. Hemler ME. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 397-422
137. Lekishvili T, Fromm E, Mujoomdar M, Berditchevski F. 2008. The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. *J Cell Sci* 121: 685-94
138. Berditchevski F, Odintsova E. 1999. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 146: 477-92
139. Rabesandratana H, Toutant JP, Reggio H, Vidal M. 1998. Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during In vitro maturation of reticulocytes. *Blood* 91: 2573-80
140. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262: 9412-20
141. Savina A, Vidal M, Colombo MI. 2002. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 115: 2505-15
142. Buschow SI, Liefhebber JM, Wubbolts R, Stoorvogel W. 2005. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol Dis* 35: 398-403

143. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106: 145-55
144. They C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 147: 599-610
145. They C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S. 2002. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3: 1156-62
146. Vega VL, Rodriguez-Silva M, Frey T, Gehrman M, Diaz JC, Steinem C, Multhoff G, Arispe N, De Maio A. 2008. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol* 180: 4299-307
147. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, They C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7: 297-303
148. Tytell M. 2005. Release of heat shock proteins (Hsps) and the effects of extracellular Hsps on neural cells and tissues. *Int J Hyperthermia* 21: 445-55
149. Andre F, Chaput N, Scharz NE, Flament C, Aubert N, Bernard J, Lemonnier F, Raposo G, Escudier B, Hsu DH, Tursz T, Amigorena S, Angevin E, Zitvogel L. 2004. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol* 172: 2126-36
150. Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U, Kahu H, Pettersson I, Telemo E. 2001. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 31: 2892-900
151. Ostman S, Taube M, Telemo E. 2005. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* 116: 464-76
152. Peche H, Renaudin K, Beriou G, Merieau E, Amigorena S, Cuturi MC. 2006. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant* 6: 1541-50
153. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4: 594-600
154. Zitvogel L, Fernandez N, Lozier A, Wolfers J, Regnault A, Raposo G, Amigorena S. 1999. Dendritic cells or their exosomes are effective biotherapies of cancer. *Eur J Cancer* 35 Suppl 3: S36-8
155. Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, Valente N, Shreeniwas R, Sutton MA, Delcayre A, Hsu DH, Le Pecq JB, Lyerly HK. 2005. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 3: 9
156. Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulleire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A,

- Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. 2005. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 3: 10
157. Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, Ruegg C, Le Pecq JB. 2002. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods* 270: 211-26
158. Schnitzer JK, Berzel S, Fajardo-Moser M, Remer KA, Moll H. Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine* 28:5785-93
159. Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. 2009. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 27: 1750-7
160. Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingard P, Dimier-Poisson I. 2004. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect Immun* 72: 4127-37
161. Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I. 2007. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect* 9: 1614-22
162. Kim SH, Lechman ER, Bianco N, Menon R, Keravala A, Nash J, Mi Z, Watkins SC, Gambotto A, Robbins PD. 2005. Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *J Immunol* 174: 6440-8
163. Kim SH, Bianco N, Menon R, Lechman ER, Shufesky WJ, Morelli AE, Robbins PD. 2006. Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Mol Ther* 13: 289-300
164. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9683-8
165. Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, Yen TS, Houghton M, Pileri P, Abrignani S. 2004. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol* 34: 2834-42
166. Temme S, Eis-Hubinger AM, McLellan AD, Koch N. The herpes simplex virus-1 encoded glycoprotein B diverts HLA-DR into the exosome pathway. 2009. *J Immunol* 184: 236-43
167. Mori Y, Koike M, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, Oyaizu H, Uchiyama Y, Yamanishi K. 2008. Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* 9: 1728-42
168. Walker JD, Maier CL, Pober JS. 2009. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4⁺ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J Immunol* 182: 1548-59
169. Dukers DF, Meij P, Vervoort MB, Vos W, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Middeldorp JM. 2000. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* 165: 663-70
170. de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102: 4336-44
171. Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, Lehmann S, Grassi J, Raposo G, Darlix JL. 2006. Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J* 25: 2674-85

172. Tumne A, Prasad VS, Chen Y, Stolz DB, Saha K, Ratner DM, Ding M, Watkins SC, Gupta P. 2009. Noncytotoxic suppression of human immunodeficiency virus type 1 transcription by exosomes secreted from CD8⁺ T cells. *J Virol* 83: 4354-64
173. Khatua AK, Taylor HE, Hildreth JE, Popik W. 2009. Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *J Virol* 83: 512-21
174. Blauvelt A, Asada H, Saville MW, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Yarchoan R, Katz SI. 1997. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J Clin Invest* 100: 2043-53
175. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3: 697-709
176. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Erkizia I, Puertas MC, Borrás FE, Blanco J, Martínez-Picado J. 2010. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog* 6: e1000740
177. Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupotic T, Bartholomeeusen K, Cheng Y, Krogan NJ, Plemenitas A, Peterlin BM. 2010. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4⁺ T cells. *Traffic* 11: 110-22
178. Sanfridson A, Hester S, Doyle C. 1997. Nef proteins encoded by human and simian immunodeficiency viruses induce the accumulation of endosomes and lysosomes in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 873-8
179. Stumptner-Cuvelette P, Jouve M, Helft J, Dugast M, Glouzman AS, Jooss K, Raposo G, Benaroch P. 2003. Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell* 14: 4857-70
180. Costa LJ, Chen N, Lopes A, Aguiar RS, Tanuri A, Plemenitas A, Peterlin BM. 2006. Interactions between Nef and AIP1 proliferate multivesicular bodies and facilitate egress of HIV-1. *Retrovirology* 3: 33
181. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C. 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 168: 3235-41
182. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, Gould SJ. 2006. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172: 923-35
183. Tai XG, Toyooka K, Yashiro Y, Abe R, Park CS, Hamaoka T, Kobayashi M, Neben S, Fujiwara H. 1997. CD9-mediated costimulation of TCR-triggered naive T cells leads to activation followed by apoptosis. *J Immunol* 159: 3799-807
184. Lane HC, Fauci AS. 1985. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annu Rev Immunol* 3: 477-500
185. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-71
186. Baier-Bitterlich G, Fuchs D, Wachter H. 1997. Chronic immune stimulation, oxidative stress, and apoptosis in HIV infection. *Biochem Pharmacol* 53: 755-63

187. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57
188. Hetts SW. 1998. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279: 300-7
189. Gao LY, Kwaik YA. 2000. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8: 306-13
190. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* 116: 2161-72
191. Havert MB, Schofield B, Griffin DE, Irani DN. 2000. Activation of divergent neuronal cell death pathways in different target cell populations during neuroadapted sindbis virus infection of mice. *J Virol* 74: 5352-6
192. Segal-Bendirdjian E, Dudognon C, Mathieu J, Hillion J, Besancon F. 2005. [Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]. *Bull Cancer* 92: 23-35
193. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21: 165-70
194. Petit F, Arnoult D, Viollet L, Estaquier J. 2003. Intrinsic and extrinsic pathways signaling during HIV-1 mediated cell death. *Biochimie* 85: 795-811
195. Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-8
196. Martinou JC. 1999. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 399: 411-2
197. Wang X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-33
198. Kissil JL, Deiss LP, Bayewitch M, Raveh T, Khaspekov G, Kimchi A. 1995. Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J Biol Chem* 270: 27932-6
199. Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-9
200. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-6
201. Salvesen GS, Dixit VM. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10964-7
202. Kissil JL, Cohen O, Raveh T, Kimchi A. 1999. Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *EMBO J* 18: 353-62
203. Morgan CJ, Jacques C, Savagner F, Tourmen Y, Mirebeau DP, Malthiery Y, Reynier P. 2001. A conserved N-terminal sequence targets human DAP3 to mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 177-81
204. Cavdar Koc E, Ranasinghe A, Burkhardt W, Blackburn K, Koc H, Moseley A, Spremulli LL. 2001. A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Lett* 492: 166-70

205. Mukamel Z, Kimchi A. 2004. Death-associated protein 3 localizes to the mitochondria and is involved in the process of mitochondrial fragmentation during cell death. *J Biol Chem* 279: 36732-8
206. Miyazaki T, Reed JC. 2001. A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol* 2: 493-500
207. Harada T, Iwai A, Miyazaki T. Identification of DELE, a novel DAP3-binding protein which is crucial for death receptor-mediated apoptosis induction. *Apoptosis*. 15:1247-55.
208. Miyazaki T, Shen M, Fujikura D, Tosa N, Kim HR, Kon S, Uede T, Reed JC. 2004. Functional role of death-associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem* 279: 44667-72
209. Murata Y, Wakoh T, Uekawa N, Sugimoto M, Asai A, Miyazaki T, Maruyama M. 2006. Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response. *FEBS Lett* 580: 6093-9
210. Tosa N, Iwai A, Tanaka T, Kumagai T, Nitta T, Chiba S, Maeda M, Takahama Y, Uede T, Miyazaki T. 2010. Critical function of death-associated protein 3 in T cell receptor-mediated apoptosis induction. *Biochem Biophys Res Commun* 395: 356-60
211. Kim Y, Seol DW. 2003. TRAIL, a mighty apoptosis inducer. *Mol Cells* 15: 283-93
212. Campioni M, Santini D, Tonini G, Murace R, Dragonetti E, Spugnini EP, Baldi A. 2005. Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance. *Exp Dermatol* 14: 811-8
213. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9: 423-32
214. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-56
215. Gilbert C, Cantin R, Barat C, Tremblay MJ. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 replication in dendritic cell-T-cell cocultures is increased upon incorporation of host LFA-1 due to higher levels of virus production in immature dendritic cells. *J Virol* 81: 7672-82
216. Gupta S, Young T, Yel L, Su H, Gollapudi S. 2007. Differential sensitivity of naive and subsets of memory CD4+ and CD8+ T cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Genes Immun* 8: 560-9
217. Aharon A, Tamari T, Brenner B. 2008. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* 100: 878-85
218. Jansen S, Arning J, Beyersmann D. 2003. Effects of the Ca ionophore a23187 on zinc-induced apoptosis in C6 glioma cells. *Biol Trace Elem Res* 96: 133-42
219. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905
220. Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, Pineiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J, Anel A. 2001. 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* 167: 6736-44

221. Baruchel S, Wainberg MA. 1992. The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *J Leukoc Biol* 52: 111-4
222. Piette J, Legrand-Poels S. 1994. HIV-1 reactivation after an oxidative stress mediated by different reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* 91: 79-89
223. McCarty DJ, Hollander JL. 1961. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med* 54: 452-60
224. Popa-Nita O, Rollet-Labelle E, Thibault N, Gilbert C, Bourgoin SG, Naccache PH. 2007. Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* 82: 763-73
225. Jackson JK, Lauener R, Duronio V, Burt HM. 1997. The involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in crystal induced human neutrophil activation. *J Rheumatol* 24: 341-8
226. Popa-Nita O, Marois L, Pare G, Naccache PH. 2008. Crystal-induced neutrophil activation: X. Proinflammatory role of the tyrosine kinase Tec. *Arthritis Rheum* 58: 1866-76
227. Shi Y, Evans JE, Rock KL. 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-21
228. Tempe D, Piechaczyk M, Bossis G. 2008. SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 36: 874-8