



HAL
open science

Implication du récepteur de mort Fas dans la formation et la sécrétion de vésicules extracellulaires

Zoé Servant

► **To cite this version:**

Zoé Servant. Implication du récepteur de mort Fas dans la formation et la sécrétion de vésicules extracellulaires. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2023. Français. NNT : 2023COAZ6051 . tel-04524697

HAL Id: tel-04524697

<https://theses.hal.science/tel-04524697v1>

Submitted on 28 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Implication du récepteur de mort Fas dans la formation et la sécrétion de vésicules extracellulaires

Zoé SERVANT

Institut de Biologie de Valrose

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en**
Interactions moléculaires et cellulaires
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Anne-Odile Hueber
Co-encadrée par : Laurent Gagnoux

Soutenue le : 22/12/2023

Devant le jury, composé de :

Dr Laurent Gagnoux,
Chargé de Recherche,
IBV, Université Côte d'Azur

Dr Anne-Odile Hueber,
Directrice de Recherche,
IBV, Université Côte d'Azur

Dr Pascal Schneider,
Directeur de Recherche,
DB, Université de Lausanne

Dr Richard Tomasini,
Directeur de Recherche,
CRCM, Université de Marseille

Implication du récepteur de mort Fas dans la formation et la sécrétion de vésicules extracellulaires

Vers une utilisation de ces vésicules
comme biomarqueur de la réponse immune

Jury :

Président du jury, Rapporteur

Dr Richard Tomasini, Directeur de Recherche,
Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Université de Marseille

Rapporteur

Dr Pascal Schneider, Directeur de Recherche,
Institut de Biochimie (BD), Université de Lausanne

Directrice de thèse

Dr Anne-Odile Hueber, Directrice de Recherche INSERM,
Institut de Biologie Valrose (IBV), Université Côte d'Azur

Co-encadrant

Dr Laurent Gagnoux, Chargé de Recherche INSERM,
Institut de Biologie Valrose (IBV), Université Côte d'Azur

Implication du récepteur de mort Fas dans la formation et la sécrétion de vésicules extracellulaires : vers une utilisation de ces vésicules comme biomarqueur de la réponse immune

Ces dernières années, l'intérêt porté à la sécrétion de vésicules membranaires, appelées vésicules extracellulaires (VE), n'a fait que grandir. Les VE, qui sont sécrétées par toutes les cellules de l'organisme, sont devenues des acteurs majeurs de la communication intercellulaire. Elles peuvent agir localement au sein d'un tissu ou à plus longue distance grâce à leur capacité à utiliser la circulation sanguine pour diffuser au sein de l'organisme. Les VE sont constituées d'une membrane lipidique et transportent des molécules bioactives (ARNs, protéines, lipides). Elles agissent en se fixant à des cellules cibles grâce à leurs molécules de surface et peuvent directement activer une réponse cellulaire et/ou être endocytées et libérer leur contenu dans le cytosol de la cellule. Les VE ont été associées à la modulation de nombreuses fonctions physiologiques ou pathologiques telles que le cancer en ayant un rôle pro- ou anti-tumoral. Les VE varient en taille, composition, fonction et mécanisme de biogenèse. Selon leur mode de biogenèse, on distingue deux catégories principales de VE : les microvésicules et les exosomes. Les microvésicules sont produites par bourgeonnement de la membrane plasmique, tandis que les exosomes sont générés selon un processus complexe dépendant d'un transport endosomal intracellulaire. L'apoptose est un type de mort cellulaire qui aboutit au démantèlement de la cellule en produisant de nombreuses VE. Cependant, les mécanismes exacts de biogenèse des VE apoptotiques, et en particulier des **exosomes apoptotiques (Apo-Exo)**, sont peu connus. De même, leur composition et leurs fonctions restent à approfondir.

L'apoptose est contrôlée par divers stimuli environnementaux, incluant l'activation des récepteurs de mort de la superfamille des récepteurs du TNF (TNFR). Le **récepteur Fas** est un récepteur de mort exprimé par la plupart des cellules et joue un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire, assurant notamment l'élimination des cellules compromises, infectées ou cancéreuses, par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. L'activation de Fas déclenche également des voies de signalisation non-apoptotique, contrôlant l'inflammation, la différenciation et la prolifération cellulaire.

Des données récentes du laboratoire démontrent l'interaction de Fas avec la Synténine-1 (Synt-1), une protéine essentielle de la biogenèse des exosomes, suggérant que l'activation de Fas pourrait jouer un rôle dans la sécrétion de ce type de VE. Les objectifs de ma thèse ont été de : *i-* déterminer si Fas est impliqué dans la genèse de VE; *ii-* identifier les mécanismes qui sous-tendent la formation de ces VE dépendants ou non de la Synt-1; *iii-* analyser le contenu et les fonctions de ces VE.

Nos résultats démontrent que l'activation du récepteur Fas génère une forte sécrétion d'Apo-Exo, qui expriment Fas à leur surface (**Fas-Apo-Exo**). Les Fas-Apo-Exo requièrent l'activation des caspases, le transport endosomal de Fas et semblent impliquer un mécanisme de biogenèse des exosomes dépendant du complexe ALIX-Synt-1. L'analyse protéomique du contenu des vésicules exosomales révèle qu'elles sont enrichies en récepteurs membranaires aux fonctions immunomodulatrices. Nous montrons que ces récepteurs co-interagissent et co-traffiquent avec le récepteur Fas activé au sein du système endosomal afin de générer les Fas-Apo-Exo exprimant ces récepteurs, suggérant une fonction immunomodulatrice de ces VE.

Dans le futur, les données obtenues pendant ma thèse permettront de tester la possibilité d'utiliser les Fas-Apo-Exo sécrétés lors de l'apoptose des cellules cancéreuses médiée par Fas comme biomarqueur de l'efficacité de la réponse immune. En effet, les VE présentent l'avantage d'être facilement isolées à partir du sang, et leur détection chez des patients permet d'identifier certaines pathologies, mais également des réponses thérapeutiques.

Mots clés : Vésicules extracellulaires, Récepteur du TNF, Apoptose, Signalisation cellulaire, Transport intracellulaire

Involvement of the death receptor Fas in the formation and secretion of extracellular vesicles : towards a use of these vesicles as a biomarker of the immune response

In the last decade, the interest in the secretion of membrane vesicles, called extracellular vesicles (EV), has grown. EV, which are secreted by all cell types, have become major players in intercellular communication. They can act locally within a tissue or at a longer distance thanks to their ability to use blood circulation to diffuse within the body. EV consist of a lipid membrane and carry bioactive molecules (RNAs, proteins, lipids). They bind to target cells through their surface molecules and can directly engage receptor-mediated signaling and/or be endocytosed and transfer their content into the cytosol of the cell. EV have been associated with the modulation of many physiological or pathological functions such as cancer by having both pro- or anti-tumoral function. EV vary in size, composition, function and biogenesis mechanism. According to their mode of biogenesis, two main categories of EV are distinguished: microvesicles and exosomes. Microvesicles are produced by budding of the plasma membrane, while exosomes are generated according to a complex process dependent on intracellular endosomal transport. Apoptosis is a type of cell death that results in the dismantling of the cell by producing numerous EV. However, the exact mechanisms of apoptotic EV biogenesis, and in particular **apoptotic exosomes (Apo-Exo)**, are poorly understood. Similarly, their composition and functions remain to be explored.

Apoptosis is controlled by various environmental stimuli, including activation of death receptors of the TNF receptor superfamily (TNFR). **Fas receptor** is a death receptor expressed by most cells and plays a major role in regulating immune response, notably by ensuring the elimination of compromised cells (infected or cancerous) by cytotoxic T and NK cells. Fas activation also triggers non-apoptotic signaling pathways, controlling inflammation, differentiation and cell proliferation.

Recent data of our laboratory demonstrate the interaction of Fas with Syntenin-1 (Synt-1), an essential protein involved in exosome biogenesis, suggesting that Fas activation may play a role in the secretion of this type of EV. The objectives of my thesis were to : *i-* determine if Fas is involved in the genesis of EV; *ii-* identify the mechanisms underlying the formation of these EV dependent or not of Synt-1; *iii-* analyze the content and functions of these EV.

Our results show that the activation of Fas trigger an important secretion of Apo-Exo, which express Fas on their surface (**Fas-Apo-Exo**). Fas-Apo-Exo require activation of caspases, the endosomal transport of Fas and seem to involve a mechanism of biogenesis of exosomes which relies on ALIX-Synt-1 complex. Proteomic analysis of the content of exosomal vesicles reveals that they are enriched with membrane receptors with immunomodulatory functions. We show that these receptors co-interact and co-traffic with activated Fas receptor within the endosomal system to generate Fas-Apo-Exo expressing Fas together with these immune interacting proteins, suggesting that these EV have an immunomodulatory function.

The data obtained during my thesis will pave the way of testing the use of Fas-Apo-Exo secreted during Fas-mediated apoptosis by cancer cells as biomarker of the immune response efficiency. Indeed, EV present the advantage of being easily isolated from blood, and their detection in patients is already used to identify certain pathologies, but also therapeutic responses.

Keywords : Extracellular vesicles, TNF receptor, Apoptosis, Cell signaling, Intracellular trafficking

Remerciements

Ainsi s'achèvent les trois années de mon doctorat. A cette occasion, je souhaite exprimer ma gratitude envers l'ensemble des personnes ayant contribué à cet accomplissement. Sa concrétisation est le fruit de nombreuses années de travail et de persévérance. Tous vos enseignements m'ont permis d'énormément progresser et y ont grandement contribué.

Je tiens à remercier les membres du Jury **Dr. Pascal Schneider et Dr. Richard Tomasini** pour avoir dédié de leur temps à la lecture de mon mémoire et l'analyse de mes recherches. Je suis honorée de bénéficier de leur expertise et de leurs conseils avisés.

Je remercie ma directrice de thèse **Dr. Anne-Odile Hueber** de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon doctorat au sein de son équipe de recherche, ainsi que pour son encadrement qui m'a permis d'évoluer, son soutien, ses conseils scientifiques et la relecture de mon mémoire de thèse.

J'adresse un remerciement particulier à mon co-encadrant de thèse **Dr. Laurent Gagnoux** pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant de superviser mes recherches. Je te suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier de tes compétences et de ta rigueur intellectuelle. Grâce à nos échanges, j'ai eu la chance d'évoluer dans ma logique scientifique. J'ai pu appréhender les différents aspects de la conduite d'un projet de recherche et l'exigence éthique que cela implique. Nous avons rencontré des difficultés, mais aussi partagé le plaisir de l'investigation scientifique. Enfin, je te remercie pour la relecture très approfondie de mon mémoire de thèse.

Je remercie vivement les membres de mon Comité de Suivi Individuel, Dr. Delphine Ciais et Dr. Jean-Paul Borg, pour leurs précieux conseils.

Je remercie également les membres de l'équipe, Dr. Aurélie Rossin et Sébastien Huault, pour leur disponibilité, leur gentillesse et pour toutes leurs remarques judicieuses et conversations constructives. Vos encouragements et votre soutien m'ont été très précieux lorsque j'ai été confrontée à des difficultés ou lorsque j'avais besoin de me changer les idées. Aurélie, je te remercie aussi pour la relecture de mon mémoire de thèse.

Je tiens à mentionner les ingénieurs des plateformes techniques de l'Institut de Biologie Valrose, en particulier de la plateforme de microscopie, pour leur contribution, leur aide et les compétences qu'ils m'ont permis d'acquérir.

Enfin, j'en profite pour remercier ma famille pour son soutien inconditionnel, sa fierté et son amour.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION.....	11
I. Les vésicules extracellulaires (VE).....	11
I.1. Historique.....	11
I.2. Biogenèse et hétérogénéité.....	12
I.2.1. La biogenèse des exosomes et des apo-exosomes.....	14
I.2.1.1. Les processus d'endocytose et de trafic d'un récepteur à travers l'endolysosome	15
<i>L'endocytose</i>	15
<i>Le système endosomal</i>	19
<i>La fusion du MVB avec la membrane plasmique : un mécanisme spécifique de la</i>	
<i>production/sécrétion des exosomes</i>	24
I.2.1.2. Les mécanismes moléculaires de formation des VIL au sein du MVB et devenir du	
MVB :.....	25
- Les mécanismes dépendants de la machinerie ESCRT.....	25
<i>ESCRT</i>	25
<i>ALIX-Synténine-1</i>	26
- Les mécanismes indépendants de la machinerie ESCRT.....	27
<i>Tétraspaines</i>	27
<i>Sphingosine-1-phosphate (S1P)</i>	28
I.2.1.3. Les mécanismes moléculaires de formation des VIL en contexte apoptotique.....	29
<i>Sphingosine-1-phosphate (S1P)</i>	30
<i>Caspases</i>	31
I.2.1.4. La régulation de la genèse des exosomes :.....	33
- En contexte viable.....	33
- En contexte apoptotique.....	34
I.2.2. La biogenèse des microvésicules et des corps apoptotiques.....	35
I.3. Les modes d'action des VE aux cellules réceptrices.....	37
I.4. Le devenir intracellulaire des VE.....	38
I.5. La composition des différentes VE : spécificité des marqueurs et diversité des	
cargos.....	39
I.5.1. La composition des exosomes et apo-exosomes.....	40
I.5.1.1. La composition des exosomes.....	40
I.5.1.2. La composition des apo-exosomes.....	41
I.5.2. La composition des microvésicules.....	42
I.5.3. La composition des corps apoptotiques.....	43
I.6. Les fonctions physiologiques des VE.....	43

I.6.1. L'élimination extracellulaire	44
I.6.2. Des médiateurs de la communication inter-cellulaire.....	45
I.6.2.1. Le fonctionnement du système nerveux central	46
I.6.2.2. Le fonctionnement du système immunitaire	46
I.6.2.3. Le fonctionnement du tissu épithélial.....	50
I.6.2.4. Le fonctionnement des cellules souches	51
I.7. Les VE en contexte pathologique	52
I.7.1. L'inflammation et la dérégulation de l'immunité.....	52
I.7.2. Le détournement au profit de l'infection virale.....	54
I.7.3. Les maladies neurodégénératives.....	55
I.7.4. Les maladies cardiovasculaires.....	57
I.7.5. Les maladies respiratoires	58
I.7.6. Les maladies métaboliques	59
I.7.7. Les cancers	60
I.7.7.1. L'acquisition du phénotype cellulaire agressif et la croissance tumorale.....	60
I.7.7.2. L'AIP (« Apoptosis-induced proliferation ») dans le développement tumoral.....	62
I.7.7.3. L'angiogenèse et la vascularisation tumorale	64
I.7.7.4. La dissémination métastatique.....	65
I.7.7.5. L'échappement au système immunitaire	67
I.7.7.6. La résistance aux thérapies anti-tumorales	69
I.8. Les techniques d'étude des VE : production, purification, analyse	71
I.8.1. Les méthodes d'induction des VE	71
I.8.2. Les méthodes de purification des VE	72
I.8.2.1. La purification des VE basée sur la densité.....	72
<i>Ultracentrifugation différentielle</i>	72
<i>Gradient de densité</i>	73
I.8.2.2. La purification des VE basée sur la taille	74
<i>Chromatographie d'exclusion de taille</i>	74
<i>Filtration et ultrafiltration</i>	74
I.8.2.3. La purification des VE basée sur l'affinité	75
<i>Immuno-affinité</i>	75
I.8.2.4. Les autres méthodes de purification	75
I.8.3. Les méthodes d'analyse des VE	76
I.8.3.1. Les méthodes d'analyse moléculaire.....	76
<i>Western Blot</i>	76
<i>Analyse par immunoabsorption</i>	76
<i>Analyses multiomiques</i>	77

I.8.3.2. Les méthodes d'analyse structurale	77
<i>Microscopie électronique à transmission</i>	77
<i>Microscopie électronique à balayage</i>	78
<i>Microscopie de force atomique</i>	78
I.8.3.3. Les méthodes d'analyse quantitative.....	79
<i>Cytométrie en flux</i>	79
<i>Analyse du suivi individuel de nanoparticules</i>	79
<i>Technique « tunable Resistive Pulse Sensing » (tRPS)</i>	80
I.9. Les intérêts thérapeutiques des VE	80
I.9.1. Biomarqueur.....	80
I.9.2. Agent thérapeutique.....	82
II. Le récepteur de mort Fas	85
II.1. Le système Fas/FasL	85
II.1.1. Découverte, structure et fonction des récepteurs de la superfamille au TNF.....	85
II.1.2. La structure du récepteur Fas.....	88
II.1.3. La structure du ligand FasL	90
II.1.4. Expression du système Fas/FasL.....	91
II.2. L'apoptose	92
II.2.1. Les généralités.....	92
II.2.1.1. Une mort cellulaire programmée.....	92
II.2.1.2. L'apoptose intrinsèque et extrinsèque	93
II.2.2. La description morphologique.....	94
II.2.3. Les caspases	97
II.2.3.1. Les généralités	97
II.2.3.2. Rôle pro-apoptotique.....	97
II.3. La signalisation médiée par le récepteur Fas	99
II.3.1. Les voies de signalisation pro-apoptotique	99
II.3.2. Les voies de signalisation non-apoptotique	101
II.4. La régulation de la signalisation du récepteur Fas	106
II.4.1. L'endocytose et le trafic intracellulaire.....	106
II.4.1.1. La régulation de la signalisation des récepteurs membranaires par l'endocytose	106
II.4.1.2. Le cas des TNFR et de Fas	108
II.4.2. Les co-récepteurs	112
II.4.3. Les modifications post-traductionnelles.....	114
II.4.3.1. La palmitoylation.....	114
II.4.3.2. La phosphorylation du domaine cytoplasmique	115
II.4.3.3. Les autres modifications post-traductionnelles.....	115

II.4.4. L'environnement lipidique	116
II.5. L'implications physio-pathologiques du système Fas/FasL	119
II.5.1. Fonction physiologique : rôles dans la régulation du système immunitaire.....	119
II.5.1.1. La chimiotaxie des phagocytes et l'élimination des cellules apoptotiques	119
II.5.1.2. L'homéostasie des lymphocytes et la régulation de l'auto-immunité et du développement tumoral	120
II.5.1.3. L'élimination des cellules compromises	121
II.5.1.4. L'homéostasie des cellules dendritiques et présentation d'antigènes	122
II.5.2. Les fonctions pathologiques	123
II.5.2.1. Les maladies auto-immunes	123
II.5.2.2. Les cancers	125
<i>Signalisation pro-tumorale du récepteur Fas</i>	125
<i>Maintien des cellules souches cancéreuses</i>	126
II.6. Le système Fas/FasL en thérapie	127
II.6.1. Les stratégies thérapeutiques dans les maladies auto-immunes	127
II.6.2. Les stratégies thérapeutiques anti-cancers.....	128
II.6.3. Biomarqueur dans le diagnostic des maladies auto-immunes et des cancers.....	130
CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET QUESTIONNEMENTS.....	132
RESULTATS	135
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	179
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	181
BIBLIOGRAPHIE.....	195

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents types d'endocytose initiant le transport des cargos, dont les récepteurs transmembranaires, au sein du système endosomal (25)

Figure 2 : Représentation schématique du système endosomal et des compartiments de transport des cargos endocytosés (adaptée à partir de N. Naslavsky et al. (80))

Figure 3 : Transport du MVB dépendant de l'activité de la petite GTPase Rab7 (116)

Figure 4 : Mécanisme de bourgeonnement interne et de fission de la membrane endosomale par le sous-complexe ESCRT-III, aboutissant à la formation des VIL (123)

Figure 5 : Mécanisme de biogenèse des VIL dépendant de la signalisation S1P/S1PR (140)

Figure 6 : Représentation schématique de la biogenèse des exosomes

Figure 7 : Représentation du mécanisme de biogenèse des apo-exosomes dépendant de la signalisation S1P/S1PR (22)

Figure 8 : Représentation des étapes conduisant à la biogenèse des apo-exosomes au sein du système endolysosomal (141)

Figure 9 : Représentation du processus de biogenèse des microvésicules

Figure 10 : Deux modes d'action des VE au niveau de la cellule réceptrice : l'interaction via les protéines transmembranaires ou la fusion avec la membrane plasmique

Figure 11 : Tableau récapitulatif des principaux marqueurs moléculaires associés à chaque catégorie de VE

Figure 12 : Les échanges immunitaires médiés par les VE : communication globale à l'échelle de l'organisme

Figure 13 : Représentation du mécanisme de production d'IL-1 β par les macrophages, induite par la fusion des apo-exosomes (22)

Figure 14 : Représentation de la voie de signalisation apoptotique induite par les exosomes exprimant HSP60 sur les cardiomyocytes (243)

Figure 15 : Acquisition du phénotype migratoire agressif de cellules saines par transfert du facteur d'épissage RBM11 via les apo-exosomes (272)

Figure 16 : Représentation de la croissance tumorale et de l'hyperperméabilité vasculaire médiées par les VE (277)

Figure 17 : Les exosomes sont responsables de la thérapie résistance des cellules sécrétrices et réceptrices (297)

Figure 18 : Méthode de purification des VE par centrifugations et ultracentrifugation séquentielles

Figure 19 : Techniques d'ingénierie des VE et d'incorporation des molécules thérapeutiques (308)

Figure 20 : Arbre phylogénétique des récepteurs au TNF avec les récepteurs de mort encadrés en rouge (378)

Figure 21 : Structure de la protéine Fas et ses principaux domaines

Figure 22 : Structure du ligand FasL et ses principaux domaines

Figure 23 : Représentation schématique de l'activité protéolytique des caspases au cours de l'apoptose (148)

Figure 24 : Structure des caspases impliquées dans la signalisation apoptotique et leurs principaux domaines (adaptée à partir de S. Shalini et al. (469))

Figure 25 : Clivages et activation de la caspase-8 (484)

Figure 26 : Signalisation apoptotique extrinsèque induite par l'activation du récepteur de mort Fas

Figure 27 : Régulation de la signalisation apoptotique par les IAP et leurs antagonistes (268)

Figure 28 : Voies de signalisation non-apoptotique associées à l'activation du récepteur Fas (505)

Figure 29 : L'activation des récepteurs de mort peut induire des modulations transcriptionnelles à l'origine de l'expression et de la production de cytokines pro-inflammatoires (511)

Figure 30 : Régulation de la signalisation apoptotique lors du transport endolysosomal du récepteur Fas médié par ENTR1 (143)

Figure 31 : Représentation schématique du mécanisme d'amplification de la signalisation TNFR1 après son incorporation dans les VIL (439)

Figure 32 : La localisation membranaire et le transport intracellulaire de Fas régulent la signalisation apoptotique de Fas

Figure 33 : Modèle schématique récapitulant la fonction inhibitrice du complexe Fas-cadherine-Dlg1 sur la signalisation apoptotique (392)

Figure 34 : Métabolisme et homéostasie des sphingolipides (575)

Figure 35 : Fas promeut l'attraction de phagocytes et l'élimination des cellules apoptotiques via l'induction de la production de cytokines et de chimiokines

Figure 36 : L'apoptose, pouvant être induite par Fas, dans la réponse immunitaire (602)

Figure 37 : Effets anti-cancers du polypeptide issu du clivage du récepteur Fas par ELANE (adaptée de (631))

Figure 38 : Fas-Apo-Exo comme biomarqueurs de l'efficacité des thérapies anti-tumorales

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM-10 : A disintegrin and metalloprotease-domain-containing protein-10

ADBE : Activity-dependent bulk endocytosis

AGO2 : Argonaute 2

AIP : Apoptosis-induced proliferation

Akt : Serine/thréonine kinase

ALIX : ALG-2-interacting protein X

ALG-2 : Apoptosis-linked gene 2

ALPL : Alkaline phosphatase protein

ALPS : Syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité

AP2 : Adaptor protein 2

APAF1 : Apoptotic protease-activating factor 1

API1/API2 : Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper-containing ½

Apo-1 : Récepteur Fas

Apo-Exo : Exosomes apoptotiques

Arf6 : ADP ribosylation factor 6

ASM : Sphingomyélinase acide

ATG12 : Autophagy-related protein 12

BCA : Acide bichoninique

BCR : Récepteurs aux lymphocytes B

BH3 : Bcl-2 homology domain (BH)3-only protein

BIR : Baculovirus IAP repeat domain

BMP9 : Bone morphogenetic protein 9

CAD : Caspase-activated DNase

CAF : Cancer-associated fibroblasts

CAR : Chimeric antigenic receptor

CAR-T : Chimeric antigenic receptor-T

CARD : Caspase recruitment domain

Caspases : Cysteine aspartyl-specific proteases

Cbl : Casitas B-lineage lymphoma

CD95 : Récepteur Fas

CD9/CD63/CD81/CD133 : Tétraspansines

Cdc42 : Cell division control protein 42
CDIC : Cytoplasmic dynein intermediate chains
c-FLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein
CID : Calcium including domain
CIE : Clathrin-independent endocytosis
CME : Clathrin-mediated endocytosis
CMH : Complexes majeurs d'histocompatibilité
CMP : Cardiomyocyte specific peptide
COL1 : Collagen type 1
CRAC : Calcium release-activated calcium channels
CRDs : Cysteine-rich domains
Crkl : ADP-ribosylating Crkl adaptor protein
CSC : Complexe de sélection des cargos
CSC : Cellule souche cancéreuse
CTLA4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DAMP : Damage-associated molecular pattern
DD : Domaine de mort
DED : Death effector domain
DISC : Death-inducing signaling complex
DOCK2 : Deducator of cytokinesis protein 2
DR : Death receptor
DSPP : Dentin sialophosphoprotein
EDAR : Ectodermal dysplasia receptor
EEA1 : Endosome antigen 1
EGFR : Epithelial growth factor receptor
EGFR-NCE : EGFR non clathrin pathway
EHD : Eps15 homology domain
ELANE : Neutrophil elastase
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
EPS15–EPS15R : EGFR pathway substrate 15-EPS15-related
ERK : Extracellular-signal-regulated kinase
ESCRT : Endosomal sorting complex required for transport
FADD : Fas-associated death domain

FAK : Focal adhesion kinase
FAP-1 : Fas-associated phosphatase-1
Fas : Récepteur Fas
Fas-Apo-Exo : Exosomes apoptotiques Fas+ dépendants de Fas
FasL : Fas ligand
FCHo : FCH domain only
FDA : Food and Drug Administration
FDS : Friction-driven scission
FEME : Fast endophilin-mediated endocytosis
FI-NTA : Suivi individuel de nanoparticules couplée à l'utilisation de fluorophores
FoxO3 : Forkhead box O3
FRET : Förster resonance energy transfer
G6PC : Glucose-6-phosphate catalytic subunit
Gal-1 : Galectin-1
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDF10 : Growth differentiation factor 10
GDIR1 : Rho GDP-dissociation inhibitor 1
GEF : Guanine nucleotide exchange factor
GM1 : Glycerophospholipid monosialotetrahexosyl ganglioside
GM-CSF : Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
GRAF1 : GTPase regulator associated with focal adhesion kinase 1
GRX1 : Thiol transferases glutaredoxin 1
GSK-3 β : Glycogen synthase kinase-3 β
GTP : Guanosine triphosphate
HD-PTP : His-domain-containing protein tyrosine phosphatase
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor-1 α
HIV : Virus de l'immunodéficience humaine
HK3 : Hexokinase 3
HMEC-1 : Human endothelial cell line 1
HMGB1 : High mobility group box 1
HPV : Papillomavirus humain
Hrs : Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase substrate

HSC70 : Heat shock cognate 70
HSP : Heat shock protein
HSP60 : Heat shock protein 60
HSP70 : Heat shock protein 70
HSP90 : Heat shock protein 90
HTLV-1 : Human T cell lymphotropic virus type 1
HTRA2 : HtrA serine peptidase 2
HUVEC : Cellules endothéliales humaines non-immortalisées
IAP : Inhibitors of apoptosis proteins
ICAM : Intercellular adhesion molecule
IFN : Interféron
IKK : I κ B kinase
IL-2R α : Interleukin-2 receptor
IP3 : Inositol triphosphate
ISEV : Société Internationale des Vésicules Extracellulaires
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JA : Jonctions adhérentes
JAK-STAT : Janus kinase-signal transducer and activator of transcription
JNK : c-Jun amino-terminal kinase
LAMP : Lysosomal-associated membrane protein
LC3 : Microtubule-associated protein light chain 3
LIMK : Kinase LIM
LINEs : Long interspersed nuclear elements
LMP1 : Latent membrane protein 1
LncARNs : Long non-coding RNA
LRR : Lysin-rich region
LTRs : Long terminal repeats
LUBAC : Linear ubiquitin chain assembly complex
MAPK : Mitogen activated protein kinases
MDM4 : Murine double minute 4
MDR1 : Multidrug resistance protein 1
MEND : Massive endocytosis
MET : Cryo-microscopie électronique à transmission

MISC : Motility-inducing signaling complex

MLC : Myosin light chain

MOMP : Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale

MPC-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

MRL/gld : Maladie lymphoproliférative généralisée

MRL/lpr : Murphy Roths Large/lymphoproliferation

mTOR : Mammalian target of rapamycin

MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium

MVB : Multivesicular body

NASH : Non-alcoholic steatohepatitis

NFAT : Nuclear factor of activated T-cell

NK : Natural killer

NpAu : Nanoparticules d'or

NSCLC : Non-small cell lung cancer

NuMA : Nuclear mitotic apparatus

NXC : Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

p75-NGFR : p-75-nerve growth factor receptor

PAK2 : p21 protein-activated kinase 2

PARP : Poly ADP-ribose polymérase

PCK1 : Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1

PD-1 : Programmed cell death protein-1

PDCD4 : Programmed cell death 4

PDCD6IP : Programmed cell death 6-interacting protein

PDGFRB : Récepteur β du facteur de croissance dérivé des plaquettes

PD-L1 : Immune-checkpoint molecules programmed death ligand 1

PDLIM5 : PDZ and LIM domain 5

PDZ : PSD95 (post synaptic density-95) ; Dlg1 (Drosophila disc large tumor suppressor) ; ZO-1 (zonula occludens-1 protein)

PGK1 : Phosphoglycerate kinase 1

P-gp : P-glycoprotein

PGRL : CD81 regulatory-like protein

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PI3P : Phosphatidylinositol 3-phosphate

PI(4,5)P2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIBF : Facteur de blocage induit par la progestérone
PIP5K1 γ : Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
PKC : Protéine kinase C
PKD : Phosphatidylinositol-dependent kinase
PLAD : Pre-ligand assembly domain
PLC γ 1 : Phospholipases C γ 1
PLD2 : Phospholipase D2
PMCA : Plasma membrane calcium ATPase
PMEL : Amyloidogenic pigment cell-specific type I integral membrane protein
PRD : Prolin-rich domain
PtdIns3P : Phosphatidylinositol 3-phosphate
PtdIns(4,5)P2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PtdSer : Phosphatidylsérine
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTPN23 : Non-receptor-type protein tyrosine phosphatase 23
RBG : Rabies virus glycoprotein
RBM11 : RNA binding motif protein 11
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RE : Réticulum endoplasmique
RICD : Restimulation-induced cell death
RILP : Rab-interacting lysosomal protein
RIP : Receptor-interacting protein
RIPK1 : Receptor interacting serine/threonine kinase 1
RLR : RIG-I-like receptors
RMN : Résonance magnétique nucléaire
ROC : Receptor-operated channel
ROCK I : Rho-associated coiled-coil containing kinases I
ROS : Molécules réactives à l'oxygène
RTK : Récepteurs à activité tyrosine kinase
Rtn3 : Réticulon-3
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
S1P : Sphingosine-1-phosphate
S1PR : Récepteurs de la sphingosine-1-phosphate

SA : Self-assembly
SARA : SmAD anchor for receptor activation
Sc-NTA : Suivi individuel de nanoparticules
SERCA : Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase
SGPL1 : Sphingosine-1-phosphatase lyase 1
SHIP-1 : SH2 (Src homology 2)-containing inositol 5'-phosphatase-1
SINEs : Short interspersed nuclear elements
SIRP α : Signal inhibitory regulatory protein α
SIRT : Sirtuine
SLE : Lupus érythémateux systémique
SMAC : Second mitochondria-derived activator of caspases
SMOC : Second messenger-operated channel
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor
SNX : Sorting nexins
SOC : Store-operated channel
Sox2ot : Sox2 overlapping transcript
SPHK2 : Sphingosine kinase 2
Spl-4 : Synaptotagmin-like protein 4
STAM : Signal transducing adaptor molecule
Synt-1 : Synténine-1
TAB1/2 : TAK-1-binding proteins
TAK1 : TGF β -activated kinase 1
Tau : Tubulin-associated unit
TCR : Récepteurs aux lymphocytes T
TDGF-1 : Teratocarcinoma-derived growth factor 1
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TfR : Récepteur à la transferrine
TGF β 1 : Transforming growth factor- β
TGN : Réseau trans-Golgi
THD : TNF homology domain
TIM : TRAF-interacting motif
TLR : Récepteurs Toll-like
TLR4 : Récepteur Toll-like 4

TNF : Tumor necrosis factor
TNF- α : Tumor necrosis factor α
TNFR : Récepteurs au TNF
TNFRSF : Superfamille des récepteurs au TNF
TNFRSF6 : Récepteur Fas
TNFSF : Superfamille du TNF
TNFSF6 : Fas ligand
TPI1 : Triosephosphate Isomerase 1
TRAF : TNF receptor associated factor
TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand
tRPS : tunable Resistive pulse sensing
TSG101 : Tumor susceptibility gene 101
TSP-1 : Thrombospondine-1
UBD : Ubiquitin binding domain
UFE : Ultrafast endocytosis
VAMP4 : Vesicle-associated membrane protein 4
VE : Vésicule extracellulaire
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VIL : Vésicule intraluminale
VOC : Voltage-operated channel
Vps : Vacuolar protein sorting-associated protein
XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein
YB-1 : Y-box binding protein 1

INTRODUCTION

I. Les vésicules extracellulaires (VE)

I.1. Historique

La première identification officielle des vésicules extracellulaires (VE) remonte à 1946. Les travaux sur la coagulation sanguine du biochimiste E. Chargaff et du clinicien R. West révèlent l'existence de particules sédimentables, extraites et collectées sous forme de culot par le biais d'une centrifugation du sang à 31 000g. Ces particules sont capables d'induire la coagulation de sang dépourvu de plaquettes sanguines. La description de ces particules sédimentables, comme acteurs de la coagulation sanguine, constitue le point de départ des études dans le domaine des VE (1).

Vingt ans plus tard, P. Wolf confirme l'existence de ces particules et les identifie sous le terme de « platelet dust ». A la manière des études actuelles, ces travaux combinent l'ultracentrifugation et la microscopie électronique afin d'approfondir la caractérisation de ces VE. Leur production par les plaquettes est alors démontrée, suggérant leur libération par un processus de sécrétion cellulaire. De plus, les observations en microscopie électronique dévoilent leur ultrastructure, démontrant qu'elles sont délimitées par une bicouche lipidique (2). N. Crawford complète cette description en révélant que les particules issues des plaquettes contiennent de nombreuses protéines telles que la protéine « contractile » Thrombosthenin et des enzymes de production d'énergie sous forme d'ATP. Ces protéines sont alors considérées comme à l'origine de leur fonction dans la coagulation sanguine. L'hétérogénéité du contenu de ces particules renforce les hypothèses émergentes de leur implication dans le transport de molécules et de leur importance biologique (3).

En 1969, H.C. Anderson démontre que de petites vésicules sont associées aux chondrocytes, et sont ensuite absorbées par ces cellules. Une potentielle implication de ces vésicules dans la minéralisation osseuse est alors envisagée. Cette étude apporte la preuve que la fonction des vésicules ne se limite pas à la coagulation sanguine et s'étend au-delà du relargage de molécules (4). En effet, les VE sont décrites comme des acteurs majeurs de la communication inter-cellulaire endocrine dès 1974. E.A. Nunez et al. mettent alors en évidence la sécrétion de VE par les cellules thyroïdiennes folliculaires de la chauve-souris lors de l'hibernation. Une première description du processus de biogenèse et de sécrétion des VE est réalisée et constitue les prémices de la découverte de ces mécanismes complexes (5). En 1975, A.J. Dalton retrouve également des VE dans le sérum bovin et dans les milieux de culture cellulaire conditionnés. La sécrétion des VE apparaît donc comme un processus généralisé et semble indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire (6).

Les années 80 marquent le commencement de l'expansion des recherches dans le domaine des VE, s'accompagnant de la multiplication des publications. L'attrait de la recherche pour les VE s'accroît encore durant les années 90. Cet intérêt grandissant s'explique par la découverte de

leur implication dans les échanges entre cellules immunitaires et dans la lutte contre les agents pathogènes, suggérant leur potentiel thérapeutique. Le rôle des VE dans les échanges entre cellules immunitaires a été clairement mis en évidence par Raposo et al. en 1996. Cette étude démontre que les cellules immunitaires sécrètent des VE leur conférant la capacité d'activer des cibles spécifiques et de réguler leur fonction cellulaire (7). Plus précisément, les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes sécrètent des VE qui expriment à leur surface les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et/ou II (CMH). Les VE participent donc au processus de présentation d'antigènes et sont capables d'activer les lymphocytes T *in vitro*. En accélérant et en amplifiant ces échanges, elles contribuent à l'efficacité de la réponse immunitaire. De plus, les VE apparaissent comme des modulateurs de la réponse immunitaire anti-tumorale et leur administration *in vivo* est décrite telle un vaccin anti-cancer. Cette étude conforte les hypothèses en faveur du potentiel thérapeutique des VE (7). En 1998, L. Zitvogel et al. confirment cette théorie (8). Les VE chargées avec des antigènes anti-tumoraux sont capables d'induire l'élimination de tumeurs de modèles murins en jouant un rôle clé dans la réponse du système immunitaire pour lutter contre le développement tumoral (8).

Depuis le début du 21^{ème} siècle, les VE sont considérées comme des biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies. Leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques a également contribué à l'explosion des recherches dans le domaine. Les investissements commerciaux et les essais cliniques pour le développement de stratégies diagnostiques et thérapeutiques basées sur les VE se multiplient. En 2012 et 2018, des fonds considérables sont injectés dans le cadre d'un programme de financement mené par l'Institut National de la Santé aux États-Unis (9).

Enfin, durant les vingt dernières années, la communauté de chercheurs se consacrant à l'étude des VE n'a cessé de s'accroître, donnant naissance à la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV) et au journal scientifique « Journal of Extracellular vesicles ». Ces initiatives ont pour but de renforcer la cohésion entre chercheurs du domaine, favorisant un effort général pour plus de rigueur et de standardisation dans l'étude des VE.

Les études actuelles s'accordent sur le fait que les VE sont des acteurs majeurs de la communication inter-cellulaire, capables de moduler le fonctionnement cellulaire et d'induire la mise en place de réponses adaptatives à l'échelle de l'organisme. Cependant, de nombreuses incompréhensions et zones d'ombres demeurent, notamment sur les spécificités de biogenèse et de contenu liées à des types particuliers de VE, ainsi que sur leurs fonctions et leur exploitation en contexte médical (9, 10).

I.2. Biogenèse et hétérogénéité

Les VE regroupent un ensemble de particules naturellement produites par les cellules et sécrétées dans l'espace extracellulaire. Toutes les cellules sont capables de libérer des VE. Les VE peuvent être générées selon différents processus, dépendants de la situation physiologique

ou pathologique, ainsi que de la nature des cellules sécrétrices, notamment viables ou apoptotiques. Parmi les VE identifiées, il est possible de mentionner en exemples les exosomes, les microvésicules, les migrasomes, les oncosomes, les « exophers » et les corps apoptotiques. Nous ne pourrions pas toutes les mentionner tant leur diversité est conséquente. Les VE se caractérisent donc par une très forte hétérogénéité, compliquant l'analyse de leurs propriétés et de leurs fonctions (11-13). De plus, de nouveaux types de particules de transport extracellulaire ont été découverts encore récemment, tels que les « exomeres » et les « supermeres », renforçant la complexité de l'étude des VE et la nécessité de progresser dans ce domaine (14).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous focaliserons sur deux catégories principales de VE relativement bien connues à ce jour, les **exosomes** et les **microvésicules**, ainsi que sur une troisième catégorie de VE libérées lors de l'apoptose, les **VE apoptotiques**. Les VE apoptotiques partagent des caractéristiques communes avec les exosomes et les microvésicules libérés par les cellules viables. Ces différentes catégories de VE sont classifiées selon leur mode de biogenèse, spécifique d'un site de production à l'échelle cellulaire (11, 12).

Nous nous conformerons à cette classification afin de correspondre aux standards actuellement admis pour l'étude des VE. Cette classification suppose une uniformisation des VE regroupées sous les termes « exosome » et « microvésicule ». Il nous paraît alors fondamental de souligner la complexité que masque l'emploi de ces termes et de garder à l'esprit l'hétérogénéité qu'il existe au sein même de ces différentes catégories. En effet, ces catégories regroupent un vaste ensemble de particules et de sous-populations de vésicules qu'il conviendrait de désigner sous des termes plus larges (par exemple, « small » versus « large EV »). Plusieurs groupes de recherche soulèvent ces problématiques et révèlent l'existence de ces sous-populations, notamment d'exosomes, généralement caractérisées par des associations de marqueurs moléculaires spécifiques (15-18).

Les exosomes sont des vésicules intraluminales (VIL) générées par l'invagination de la membrane du compartiment endosomal appelé corps multivésiculaire (MVB : « Multivesicular body »). Les exosomes présentent un diamètre compris entre 30 et 100 nm et sont sécrétés lors de la fusion du MVB avec la membrane plasmique de la cellule (11, 19). Quant aux microvésicules, elles sont produites par invagination et bourgeonnement externes, puis fission, de la membrane plasmique de la cellule. Leur diamètre est compris entre 50 et 1000 nm (20). En résumé, tandis que les microvésicules sont produites par invagination extracellulaire de la membrane plasmique, la biogenèse des exosomes est un mécanisme plus complexe qui débute par un phénomène d'endocytose et se poursuit au sein du système endolysosomal (11). Etant donné la variabilité de taille, de morphologie et de composition des VE, la classification selon le mode de biogenèse apparaît comme la plus pertinente (21).

La troisième catégorie de VE correspond aux VE sécrétées par les cellules mourantes par apoptose. La production des VE est particulièrement amplifiée au cours de l'apoptose, assurant

le démantèlement de la cellule mourante. Au même titre que les VE produites en contexte non apoptotique, les VE apoptotiques présentent des modes de biogenèse et des caractéristiques morphologiques variés. Trois types de VE apoptotiques se distinguent : les corps apoptotiques, les microvésicules et les apo-exosomes (12).

Les corps apoptotiques se caractérisent par un diamètre particulièrement conséquent, de 1 à 5 µm. Ils sont principalement générés lors du processus de fragmentation cellulaire et par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule. L'apoptose est également associée à la production de microvésicules apoptotiques, d'un diamètre compris entre 200 nm et 1 µm, et produites par invagination et bourgeonnement externes de la membrane plasmique (12, 20). Les exosomes produits en contexte apoptotique (les apo-exosomes), d'un diamètre compris entre 50 et 100 nm, voire 200 nm, sont produits par le biais d'un mécanisme plus complexe, débutant par l'endocytose de protéines situées à la membrane plasmique, suivie d'un trafic intracellulaire de ces protéines au sein du système endosomal. La génération des apo-exosomes au sein de l'endosome, plus précisément au niveau de la membrane du MVB, est un processus similaire à celui des exosomes produits en contexte non apoptotique. Les mécanismes moléculaires exacts de la biogenèse des exosomes dans un contexte apoptotique demeurent peu connus. Cependant, la mise en jeu de ces mécanismes dans un contexte apoptotique suggère leur particularité. La composition et les fonctions des apo-exosomes n'ont également été que très peu étudiées (12, 22).

I.2.1. La biogenèse des exosomes et des apo-exosomes

La biogenèse des exosomes débute par l'endocytose des protéines cargos, correspondant alors à des protéines et récepteurs transmembranaires exprimés à la surface de la cellule. Au cours de leur transport au sein du système endosomal, ces protéines et récepteurs parviennent au MVB, à l'intérieur duquel sont formées les VIL. La fusion du MVB avec la membrane plasmique est ensuite responsable de la libération des exosomes (11, 12, 19).

Lors du processus classique d'endocytose d'un récepteur transmembranaire activé, ce dernier rejoint l'endosome à partir duquel il peut être recyclé par retour à la membrane ou être inactivé par son incorporation au sein de VIL puis dégradé par la fusion du MVB avec le compartiment lysosomal (23). Cependant, ce phénomène de dégradation des récepteurs peut être contrebalancé par la fusion du MVB avec la membrane plasmique de la cellule, et par conséquent, la sécrétion des exosomes et de leur contenu, dont les récepteurs. La régulation de la balance entre la dégradation et la sécrétion du contenu du MVB, qui reste encore peu explorée, est l'étape clé qui conditionne la production/sécrétion des exosomes (12).

Dans un premier temps, le devenir du récepteur transmembranaire à la suite de son activation en surface sera présenté, conduisant à son lieu de dégradation ou sa sécrétion exosomale. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la sécrétion des exosomes à partir du MVB seront

alors définis. Dans un second temps, les mécanismes moléculaires de la biogenèse des VIL au sein du MVB seront exposés. Les mécanismes de biogenèse des exosomes en contexte apoptotique, décrits à ce jour par uniquement deux principaux groupes de recherche, seront également présentés. Il paraît alors important de souligner que seules ces deux études s'attachent à décrire précisément les mécanismes moléculaires de la biogenèse des exosomes en contexte apoptotique.

I.2.1.1. Les processus d'endocytose et de trafic d'un récepteur à travers l'endolysosome

L'endocytose

L'ensemble des processus d'endocytose qui vont être présentés conduisent à la formation de vésicules membranaires dans le milieu intracellulaire, d'un diamètre moyen compris entre 60 et 120 nm. Ces vésicules d'endocytose expriment et transportent différentes molécules cargos, dont des récepteurs transmembranaires, depuis la membrane plasmique vers les compartiments subcellulaires, en particulier le compartiment endosomal. Les vésicules d'endocytose vouées à fusionner avec le compartiment endosomal initient le transport des récepteurs au sein du système endolysosomal (24-27).

Différents mécanismes d'endocytose peuvent alors intervenir, qui se divisent en deux catégories, à savoir, l'endocytose médiée par la clathrine ou indépendante de la clathrine. L'endocytose indépendante de la clathrine regroupe de nombreuses formes dépendantes ou non de la dynamine.

La voie majeure d'internalisation des cargos est l'**endocytose médiée par les clathrines (CME pour « Clathrin-Mediated Endocytosis »)**, qui est, comme son nom l'indique, assurée par la clathrine, ainsi que par la protéine adaptatrice AP2 (adaptor protein 2) et la dynamine. Elle constitue une voie majeure d'internalisation dans les cellules de nombreux récepteurs transmembranaires à la suite de leur activation, en particulier le récepteur à la transferrine (TfR) (24). La nucléation est la première étape de la CME et correspond à la formation d'une invagination membranaire interne appelée « pit ». Elle est initiée par le recrutement des protéines FCHo (FCH domain only) qui lient les domaines de la membrane plasmique enrichis en phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P2) (28). Ces protéines permettent, à leur tour, le recrutement de EPS15-EPS15R (« EGFR pathway substrate 15-EPS15-related »). Cette étape d'initiation est achevée par l'association de la protéine adaptatrice AP2 via des motifs d'endocytose présents au niveau de la queue cytoplasmique des récepteurs transmembranaires, mais également via le PtdIns(4,5)P2 de la membrane plasmique (24, 29, 30). La nucléation est suivie de l'étape de sélection des cargos. AP2 recrute différentes classes de récepteurs directement via ses sous-unités μ et σ . D'autres adaptateurs spécifiques de cargos, tels que Stonin 2 et Numb, s'associent à AP2 et assurent la prise en charge de récepteurs spécifiques au

sein du processus d'endocytose (31-33). Par la suite, le manteau de clathrine est assemblé par le recrutement des triskèles de clathrines, appelés triskélions, dont les branches s'assemblent pour former des structures d'hexagones et de pentagones. La polymérisation du manteau de clathrine résulte en la stabilisation de la courbure membranaire et le « pit » initial devient le « clathrin-coated pit » (34-36). Une fois formé, l'étape de scission du « clathrin-coated pit », pour libérer la vésicule d'endocytose dans le milieu intracellulaire, est dépendante de l'enzyme dynamine (37). La GTPase dynamine est recrutée au niveau du col de la vésicule par les protéines contenant des domaines BAR de liaison avec le domaine pro-rich de la dynamine, telles que amphiphysine, endophiline et sorting nexin 9 (38-40). Le mécanisme précis de scission n'est pas clairement décrit mais le changement conformationnel de la dynamine, dépendant de l'hydrolyse du GTP (guanosine triphosphate), semble être à l'origine du processus de fission des membranes (41, 42). À la suite du détachement de la membrane plasmique, le manteau de clathrine est désassemblé par action de l'ATPase HSC70 (heat shock cognate 70), permettant à la vésicule d'endocytose de transiter, puis de fusionner avec le compartiment endosomal (43, 44).

La dynamine est également impliquée dans de nombreuses autres voies d'endocytose et de formation des vésicules d'**endocytose indépendantes de la clathrine (CIE pour « Clathrin-Independent Endocytosis »)**, impliquant différents partenaires d'interaction. La FEME, pour « Fast Endophilin-Mediated Endocytosis », constitue un mécanisme d'endocytose dépendant de la dynamine et de l'endophiline et indépendant de la clathrine, responsable de l'internalisation de récepteurs, tels que le récepteur $\beta 1$ adrénergique, dans les 5 à 10 secondes suivant leur activation (25). La FEME débute par l'activation de la signalisation des protéines kinases PI3K (phosphoinositide 3-kinase), Akt (serine/thréonine kinase) et ERK (extracellular-signal-regulated kinase), conduisant à l'inactivation de GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β) (45, 46). Les récepteurs activés sont recrutés au niveau de l'invagination naissante par interaction directe avec l'endophiline, comme le récepteur $\beta 1$ adrénergique, ou par liaison avec des protéines adaptatrices, telles que Cbl-CIN85 pour le récepteur EGFR (epithelial growth factor receptor) (25). L'addition locale de molécules d'endophiline au niveau des récepteurs activés conduit à la courbure de la membrane, renforcée par la polymérisation locale du réseau d'actine. La dynamine est ensuite recrutée par l'endophiline et le détachement de la vésicule d'endocytose est médié par l'action de cette enzyme, dépendante de l'hydrolyse du GTP (47). La scission est également permise par la tension membranaire imposée par les modulations locales du cytosquelette d'actine, combinées aux remaniements des lipides membranaires de type FDS (« friction-driven scission »), assurés par l'interaction lipides-endophiline, via le domaine N-BAR de l'endophiline (48, 49). Une fois détachée de la membrane plasmique, la vésicule d'endocytose est prise en charge par le moteur moléculaire dynéine et transite vers sa destination sur le réseau de microtubules (45).

Par ailleurs, d'autres mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine, mais dépendants de la dynamine pour le processus de scission, existent. L'endocytose EGFR-NCE, pour « EGFR

Non Clathrin Pathway », en fait partie et est régulée par la protéine Réticulon-3 (Rtn3). Elle assure l'internalisation du récepteur EGFR activé, spécifiquement sous des doses faibles de ligand EGF (epithelial growth factor) (50). L'internalisation constitutive du récepteur IL2R β et des récepteurs couplés aux protéines G correspond à un autre de ces mécanismes d'endocytose, sous le contrôle de la GTPase Rac1, qui active le complexe régulateur WAVE (51, 52).

Les mécanismes ADBE, pour « Activity-Dependent Bulk Endocytosis », et UFE, pour « Ultrafast Endocytosis », constituent deux autres processus de CIE et dépendants de la dynamine, induits par la dépolarisation axonale dans le cadre de la stimulation neuronale. L'endocytose ADBE est contrôlée principalement par la dynamine et assure l'internalisation de VAMP4 (vesicle-associated membrane protein 4) au sein de large portion de membrane, tandis que l'endocytose UFE est responsable du recyclage des composants des vésicules synaptiques, potentiellement des protéines SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor). Cette endocytose se produit dans les 50 à 100 ms suivant le potentiel d'action neuronal, et est médiée par l'endophiline, la dynamine et la synaptojanin, cette dernière étant impliquée dans le désassemblage final du manteau protéique de formation de la vésicule (53, 54).

Enfin, l'endocytose dépendante des cavéolines, à l'origine de la formation d'invaginations de la membrane plasmique appelées cavéoles, se produit spécifiquement au niveau de microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et glycosphingolipides, correspondant aux radeaux lipidiques (« rafts »). L'interaction directe de la cavéoline avec le cholestérol a été démontrée (55, 56). Ce mode d'internalisation ne semble pas être spécifiquement impliqué dans le recrutement des récepteurs, mais apparaît plutôt comme un processus d'endocytose générale de cargos transmembranaires concentrés au niveau des rafts lipidiques, susceptibles d'inclure des récepteurs activés. En effet, les rafts lipidiques constituent des plateformes propices à l'oligomérisation et à l'initiation de la signalisation des récepteurs, et par conséquent, à leur internalisation (26, 57-59). Dans les cellules endothéliales, l'endocytose dépendante des cavéolines est un processus constitutif. Dans les autres types cellulaires, elle semble être un mécanisme régulé, cependant sa compréhension moléculaire reste basique (60). L'endocytose dépendante des cavéolines requiert le recrutement transitoire de la dynamine, la polymérisation des filaments d'actine et la formation de la cavéole, de manière très similaire au processus médié par les clathrines (26, 61-63).

Plusieurs mécanismes d'endocytose **indépendants de la clathrine et de la dynamine** sont également décrits et reposent sur d'autres acteurs moléculaires tels que les petites GTPases Arf6 et Cdc42, les flotillines et les mouvements d'ions calcium (27).

Le processus moléculaire d'endocytose induit par la petite GTPase Arf6 (ADP ribosylation factor 6) reste incertain mais semble impliquer des remodelages de l'actine. Son activation provoque la formation de protrusions cellulaires. L'association de GTP avec Arf6 induit son changement de conformation à l'origine du recrutement d'effecteurs et de l'initiation du transport intracellulaire (64).

Arf6 serait impliquée dans l'endocytose de multiples protéines et récepteurs tels que les CMH-I/II, l'IL-2R α (interleukin-2 receptor), les récepteurs muscariniques M2, les intégrines β 1 et PMP22 (27, 65-67).

La protéine Cdc42 (cell division control protein 42) est une autre petite GTPase qui induit un processus d'endocytose impliquant les régulateurs des GTPases GRAF1 (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase 1) et Arf1 (68, 69). Ce mécanisme, encore peu décrit, est dépendant de la balance entre la forme active de Cdc42, associée au GTP, et la forme inactive de Cdc42, associée au GDP. Ce type d'endocytose est notamment responsable de l'internalisation de récepteurs des lymphocytes T (70).

Les flotillines se caractérisent par leur forte capacité à constituer des clusters sous forme de microdomaines membranaires. La formation de ces microdomaines provoque l'invagination interne de la membrane plasmique de la cellule. La phosphorylation des résidus tyrosines des flotillines (Tyr160 de la flotilline-1 et Tyr163 de flotilline-2) par Fyn, une kinase de la famille Src, est à l'origine des remaniements intra-membranaires des flotillines, et par conséquent, des processus d'invagination interne et d'endocytose des microdomaines enrichis en flotillines (71, 72). De nombreuses protéines ont été montrées comme étant endocytosées via les flotillines, incluant CD59, le récepteur de la toxine cholérique, GM1 (glycerophospholipid monosialotetrahexosyl ganglioside) et TDGF-1 (teratocarcinoma-derived growth factor 1) (27, 73, 74).

La pinocytose est un processus d'endocytose par lequel la cellule internalise une importante quantité de milieu extracellulaire et permet la capture non spécifique de micromolécules et de solutés au sein de vésicules d'endocytose. Ces vésicules sont formées par l'invagination interne de la membrane plasmique et la mobilisation des filaments d'actine. Deux types de pinocytose se distinguent : la micropinocytose et la macropinocytose. Tandis que la micropinocytose aboutit à la formation de vésicules d'endocytose de diamètres comparables aux autres mécanismes, d'en moyenne 80 nm, la macropinocytose est impliquée dans la genèse de vésicules de plus larges diamètres, compris entre 0,5 et 5 μ m, permettant ainsi l'internalisation de quantité particulièrement conséquente de milieu extracellulaire. La macropinocytose a notamment été décrite pour être impliquée dans l'internalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), par exemple EGFR, après une activation massive de ces récepteurs par leur ligand extracellulaire, et est médiée par les petites protéines G Ras et Rac1 (27, 75, 76).

Les modulations de la concentration en calcium intracellulaire jouent un rôle essentiel dans la transmission synaptique et l'internalisation de vésicules à la suite du relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (77). Les modulations de la concentration en calcium intracellulaire constituent l'élément clé qui détermine le taux d'endocytose. L'augmentation initiale du calcium induit, dans un premier temps, une endocytose lente. Au fur et à mesure que le calcium augmente, les processus d'endocytose s'amplifient et génèrent des vésicules intracellulaires particulièrement massives (27, 78). La MEND, pour « *Massive*

Endocytosis », correspond à une absorption consécutive de membrane susceptible d'intervenir à la suite de modulations de la concentration en calcium intracellulaire. La concentration en calcium intracellulaire est finement modulée par des canaux calciques SOC (store-operated channel), VOC (voltage-operated channel), SMOC (second messenger-operated channel) et ROC (receptor-operated channel) de la membrane plasmique, par l'ATPase SERCA (sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase) qui pompe le calcium du cytosol vers le réticulum endoplasmique, par l'ATPase PMCA (plasma membrane calcium ATPase) qui pompe le calcium du cytosol vers l'espace extracellulaire, ainsi que par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NXC) expulsant le calcium vers le milieu extracellulaire (25, 79).

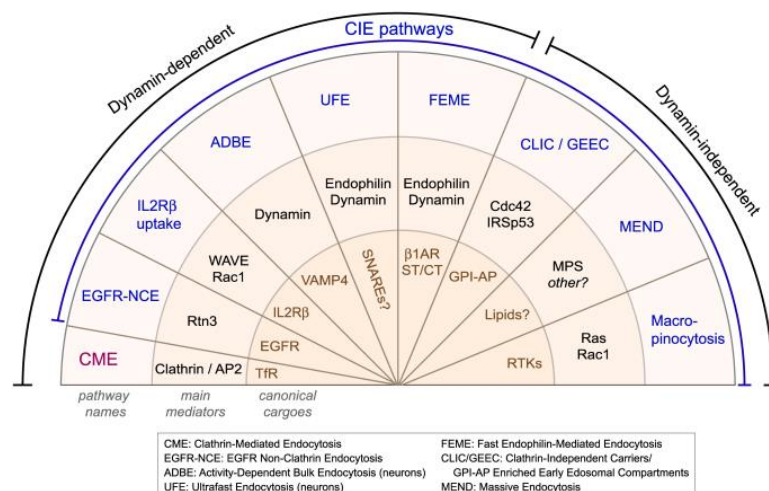


Figure 1 : Les différents types d'endocytose initiant le transport des cargos, dont les récepteurs transmembranaires, au sein du système endosomal (25)

Par conséquent, de nombreux mécanismes, impliquant divers acteurs moléculaires, conduisent à l'endocytose des récepteurs membranaires. Au vu des exemples précédemment mentionnés, l'endocytose de nombreux récepteurs ne semble pas dépendre d'un seul mécanisme, mais au contraire, peut être assurée par plusieurs mécanismes distincts.

Le système endosomal

Différentes alternatives du transport des récepteurs endocytosés existent, impliquant un transit via divers compartiments. Une fois internalisés à partir de la membrane plasmique, les récepteurs sont, dans un premier temps, transportés via des vésicules d'endocytose depuis la surface cellulaire vers le compartiment endosomal précoce (1). L'endosome précoce est un compartiment de tri des récepteurs qui peuvent ensuite être : *i-* recyclés par retour direct à la membrane plasmique ou par l'intermédiaire de leur transfert dans des compartiments de recyclage (2), comme l'endosome de recyclage ou le réseau trans-Golgi ; *ii-* dégradés par transport via l'endosome tardif (2') et la fusion de ce compartiment avec le lysosome (3). A partir du compartiment endosomal tardif, un autre devenir que l'envoi au lysosome pour dégradation est possible. En effet, les récepteurs peuvent être incorporés au sein des VIL et l'endosome tardif

correspond au MVB (2'). La fusion du MVB avec la membrane plasmique de la cellule conduit à la sécrétion des récepteurs à la surface d'exosomes dans le milieu extracellulaire. (Cf. le schéma ci-dessous pour la correspondance des chiffres)

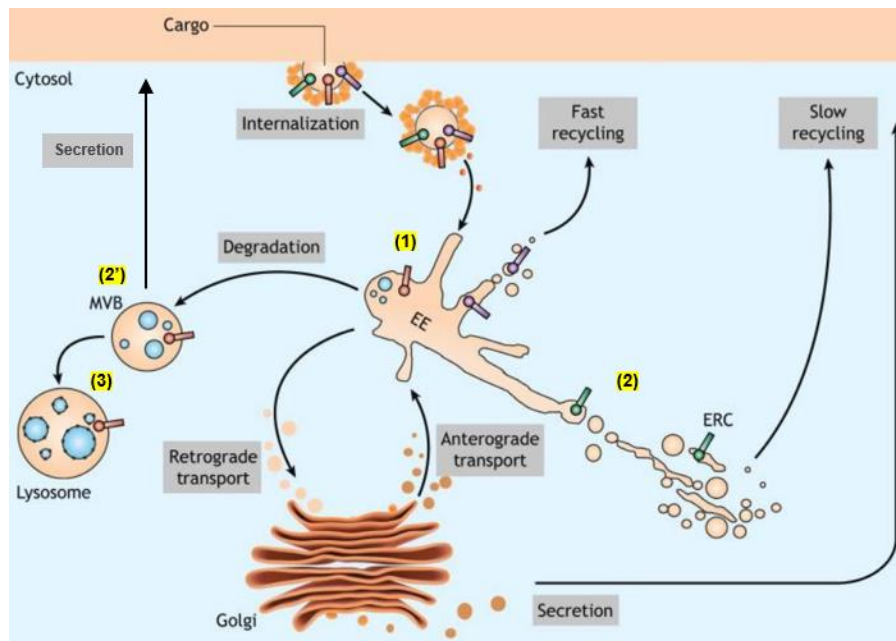


Figure 2 : Représentation schématique du système endosomal et des compartiments de transport des cargos endocytosés (adaptée à partir de N. Naslavsky et al. (80))

L'endocytose des récepteurs conduit à la formation de vésicules d'endocytose à la surface desquelles on retrouve ces récepteurs dont le domaine cytoplasmique est encore en contact avec le cytosol. Ces vésicules d'endocytose convergent vers le compartiment subcellulaire correspondant à **l'endosome précoce** avec lequel elles fusionnent (81, 82). C'est le complexe SNARE qui est impliqué dans la fusion entre les vésicules internalisées et l'endosome précoce (83, 84).

Plusieurs études démontrent que la bicouche lipidique de l'endosome précoce présente une composition lipidique particulière et est notamment riche en phosphoinositides, dont le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), généré par la kinase PI3P (81, 85). Par conséquent, l'endosome précoce permet le recrutement de protéines à domaine de liaison au PI3P, en particulier EEA1 (endosome antigen 1), pouvant être considérée comme un marqueur moléculaire de l'endosome précoce (86-88). De plus, un grand nombre de protéines de la famille des petites GTPases Rab, régulateurs majeurs de toutes les étapes du transport entre organelles cellulaires et interagissant avec divers moteurs moléculaires et complexes d'arrimage des vésicules de transport, se localise au niveau de l'endosome précoce, incluant Rab5 associée au PIP3 membranaire (88, 89).

S'il est majoritairement admis que les récepteurs internalisés sont directement dirigés vers l'endosome précoce, une hypothèse, de plus en plus approuvée, suggère l'existence d'un pré-endosome précoce, au niveau duquel les récepteurs seraient triés et envoyés vers des sous-

populations spécifiques d'endosomes précoces, en fonction de leur mode d'internalisation. Cette hétérogénéité des endosomes précoces contribuerait à conditionner le devenir des récepteurs au sein du système endosomal (80, 90).

Au sein de l'endosome précoce, le devenir des récepteurs est déterminé entre la voie de dégradation vers l'endosome tardif ou la voie de recyclage par retour vers la membrane plasmique de manière directe et rapide. Un recyclage lent des récepteurs existe également du fait de leur transit via un compartiment endosomal de recyclage péri-nucléaire avant leur retour à la membrane, ou via un transport rétrograde vers le réseau trans-Golgi (TGN) ou le réticulum endoplasmique (RE) (91, 92). Notre propos portant sur le système endosomal, nous nous attacherons à détailler le recyclage rapide et le recyclage lent uniquement via l'endosome de recyclage péri-nucléaire, qui impliquent notamment des acteurs moléculaires communs avec le transport rétrograde vers le TGN, voie de recyclage que nous n'approfondirons pas, au même titre que le recyclage via le RE (80).

Dans un contexte de recyclage endosomal, deux voies sont en effet possibles : une voie de recyclage rapide ou une voie de recyclage lent. Dans le cadre de la voie de recyclage rapide, les récepteurs transitent directement vers la membrane plasmique. Seules quelques études décrivent ce phénomène. Le groupe M. Zerial et al. démontre l'implication des protéines Rab4 et 5 dans la formation de microdomaines au sein de la membrane endosomale qui conditionnent leur retour direct à la membrane plasmique. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts restent incompris (93). A l'inverse, la voie de recyclage lent consiste en des processus d'invagination externe et de fission de la membrane endosomale, produisant des structures tubulaires et/ou vésiculaires qui assurent, dans un premier temps, le transport des récepteurs vers l'endosome de recyclage péri-nucléaire via le réseau de microtubules (94). Dans un second temps, selon ces mêmes phénomènes, des vésicules sont générées à partir de l'endosome de recyclage pour transporter les récepteurs en direction de la membrane plasmique (95).

Le complexe rétromère regroupe les protéines majeures impliquées dans le tri et le transport des récepteurs à partir de l'endosome précoce pour leur recyclage (91, 92, 96). Le rétromère se divise en deux sous-complexes : (1) un trimère composé de Vps35, Vps26 et de Vps29 (vacuolar protein sorting-associated protein), connu comme le complexe de sélection des cargos (CSC) et (2) un dimère comprenant les sorting nexins Snx1 ou Snx2, et Snx5, Snx6 ou Snx32 (97). Tandis que les sorting nexins contiennent un domaine PX d'interaction avec le PI3P et assurent la prise en charge de divers cargos, le CSC interagit avec des cargos spécifiques (92, 98). Des études récentes impliquent également Snx17 et Snx27 dans la sélection des cargos, notamment des récepteurs (99, 100). Snx27 interagit avec de multiples cargos via son domaine PDZ (« PDZ-binding domain ») (PSD95 (post synaptic density-95) ; Dlg1 (drosophila disc large tumor suppressor) ; ZO-1 (zonula occludens-1 protein)), liant des protéines avec des motifs de liaison au domaine PDZ ou avec des acides aminés phosphorylés (99).

L'endosome de recyclage présente quelques caractéristiques uniques. Il se localise principalement au niveau de la région péri-nucléaire, présente une forme tubulaire et est enrichi des protéines Rab11, Rab8, Rab22a, Arf6, EHD1 et/ou MICAL-L1 (94, 95, 101, 102). Les protéines EHD (EHD 1 à 4) (Eps15 homology domain) semblent spécifiquement impliquées dans le transport des récepteurs depuis l'endosome de recyclage. En particulier, EHD1 est impliquée dans le retour à la membrane plasmique, tandis que EHD4 favorise un transit des récepteurs vers l'endosome tardif (102). Le complexe SNARE est également requis dans la fusion des structures tubulo-vésiculaires issues de l'endosome précoce avec l'endosome de recyclage, incluant les protéines syntaxin 13, Vt1b et VAMP4 (103-105).

Cependant, un mécanisme alternatif d'évolution de l'endosome précoce en endosome de recyclage est également proposé, selon lequel l'endosome précoce acquiert des caractéristiques de l'endosome de recyclage, notamment la présence de Rab11, au cours de sa relocalisation au niveau de la région péri-nucléaire. Ce transport serait médié par le moteur moléculaire dynéine, en revanche, le processus précis de maturation de l'endosome précoce en endosome tardif reste à élucider (80, 101, 102, 106, 107).

L'endosome tardif se caractérise par un enrichissement en lipides tels que le phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate et le 2'-dioléoyl lysobisphosphatidic acid (108, 109). L'endosome tardif ne présente pas de protéines Rab4 et 5, qui sont remplacées par la protéine Rab7. Rab7 est quelque peu présente dès le compartiment endosomal précoce mais peut être considérée comme un marqueur moléculaire de l'endosome tardif. Certaines études s'accordent donc sur un processus de conversion/maturation de l'endosome précoce en endosome tardif. Ce changement d'identité du compartiment endosomal se traduit par le remplacement de Rab4/5 par Rab7. Ce changement des Rab GTPases serait médié par le facteur d'échange nucléotidique de Rab7 GEF (guanine nucleotide exchange factor), mais demeure largement incompris (110). Cependant, ce phénomène de maturation n'est pas unanimement admis. En effet, des vésicules de transit entre compartiments pourraient à nouveau être générées (80). De plus, l'endosome tardif se caractérise par la présence du marqueur lysosomal LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1) et est parfois considéré comme une partie du lysosome, la voie dégradative correspondant au système endolysosomal incluant donc l'endosome tardif (111). Enfin, les différences de morphologie et de localisation intracellulaire entre l'endosome tardif et le lysosome sont ténues (112).

S'agissant du **MVB**, le consensus grandissant est fondé sur la formation de ce compartiment endosomal tardif à partir de l'invagination externe et de la fission de la membrane de l'endosome précoce (112). Tout comme l'endosome tardif, les MVB sont caractérisés par la conversion de Rab5 en Rab7. Cependant, la spécificité du MVB réside dans la génération des VIL, relarguées au sein de son lumen, à la suite de l'invagination interne de la membrane endosomale. Différents mécanismes de biogenèse des VIL, qui seront présentés par la suite, peuvent alors intervenir (partie « I.2.1.2. Les mécanismes moléculaires de formation des VIL au sein du MVB et devenir

du MVB »). Dans un contexte classique de transit du récepteur au sein du système endosomal, la formation des VIL est un prérequis à la dégradation lysosomale du récepteur, et par conséquent à sa désactivation. Cependant, la biogenèse des VIL est un processus commun à la dégradation des récepteurs et à la production/sécrétion des exosomes. Certains mécanismes sont décrits pour leur implication dans la détermination du devenir du contenu des MVB, les VIL et récepteurs associés (23, 113-115).

Le MVB contient alors un grand nombre de VIL dont les mécanismes de biogenèse et la composition participent à la détermination de son devenir. Le MVB peut alors évoluer de deux manières principales: *i*- il fusionne avec la membrane plasmique de la cellule, libérant les VIL, appelées alors exosomes, dans le milieu extracellulaire ; *ii*- il fusionne avec le compartiment lysosomal induisant la dégradation des VIL et de leur contenu (116). Ces différents mécanismes de fusion sont à nouveau médiés par le complexe SNARE (113).

Les mécanismes de formation des VIL semblent être un paramètre déterminant dans la balance entre sécrétion et dégradation du contenu des MVB (12). Plusieurs études s'accordent sur le fait que les mécanismes de formation des VIL dépendants de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), associés à l'ubiquitinylation des récepteurs, majoritairement médiée par les ubiquitines ligases de la famille Cbl (casitas B-lineage lymphoma), favorisent leur envoi à la dégradation (23). A l'inverse, les mécanismes de formation des VIL indépendants de la machinerie ESCRT semblent préférentiellement promouvoir la fusion avec la membrane plasmique et donc la sécrétion des exosomes (12).

Cependant, les mécanismes de formation des VIL ne semblent pas être le seul facteur conditionnant le devenir des MVB entre dégradation et fusion à la membrane plasmique. Certaines études démontrent que les protéines de la famille des petites GTPases Rab sont des acteurs majeurs du transport du MVB, et de ce fait, conditionnent grandement son devenir, en particulier l'activité de Rab7. La signalisation Arl8b/SKIP/HOPS pourrait alors permettre le recrutement de la protéine activatrice des GTPases, GAP TBC1D15, à l'origine de l'inactivation et de l'élimination de Rab7 du MVB. L'inactivation de Rab7 rend possible le mouvement du MVB par action du moteur moléculaire kinésine. Le MVB évolue alors en direction de la membrane plasmique de la cellule, s'orientant vers la fusion avec la membrane plasmique et la sécrétion des exosomes. A l'inverse, l'effecteur de Rab7, RILP (Rab-interacting lysosomal protein), permettrait le transport du MVB, dépendant du moteur moléculaire dynéine, vers la région péri-nucléaire, s'orientant cette fois vers une dégradation lysosomale des VIL et de leur contenu (116, 117).

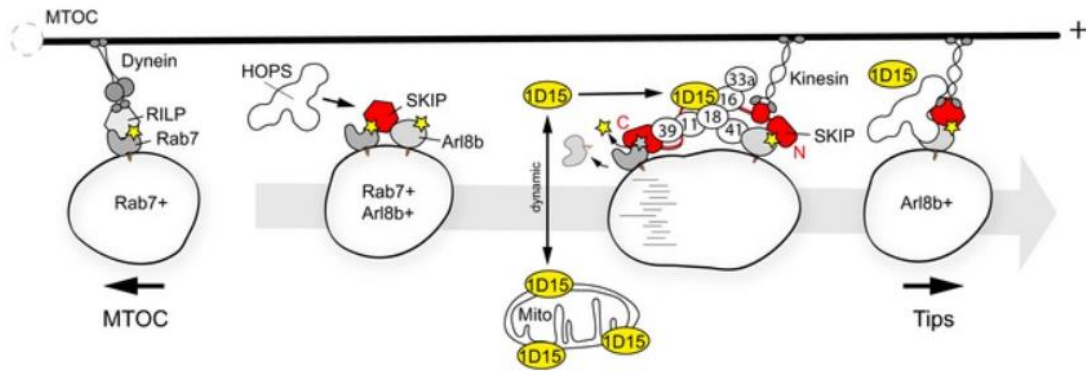


Figure 3 : Transport du MVB dépendant de l'activité de la petite GTPase Rab7 (116)

Rab31 serait également impliquée dans la modulation de l'activité de Rab7 par le biais de la GAP TBC1D2B. Rab31 induit alors l'inactivation de Rab7 qui inhibe la dégradation du MVB et favorise sa fusion avec la membrane plasmique et la sécrétion des exosomes (118, 119).

Les petites GTPases Rab semblent donc jouer un rôle déterminant dans le transport des MVB vers leur destination finale.

La fusion du MVB avec la membrane plasmique : un mécanisme spécifique de la production/sécrétion des exosomes

Lorsque le MVB est voué à fusionner avec la membrane plasmique de la cellule, cette fusion aboutit à la production/sécrétion des exosomes dans le milieu extracellulaire. Les protéines Rab sont impliquées dans l'association et l'ancrage du MVB à la membrane plasmique, en particulier Rab27a, localisée à la membrane endosomale (120). L'effecteur de Rab27a, Spl-4 (synaptotagmin-like protein 4), joue le rôle d'intermédiaire entre Rab27a et le complexe de fusion membranaire SNARE à la membrane plasmique de la cellule. Spl-4 interagit avec Rab27a via son domaine N-terminal et avec le complexe SNARE via un domaine central de liaison. L'affinité et la force de l'association sont également médiées par le biais de deux domaines en tandem d'affinité pour le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate au niveau de l'extrémité C-terminale de Spl-4. Cette association supplémentaire avec les lipides renforce la sélectivité de la reconnaissance et l'affinité de l'association (121).

Une fois ancré, le MVB fusionne avec la membrane plasmique de la cellule de manière dépendante du complexe SNARE. Les SNAREs s'enroulent entre elles pour constituer une structure stable à quatre hélices. Le complexe trans-SNARE ainsi formé verrouille les deux membranes ensemble et les rapproche l'une contre l'autre. La fusion des deux membranes se produit et les exosomes sont relargués dans le milieu extracellulaire. La fusion du MVB avec la membrane plasmique de la cellule concrétise la biogenèse des exosomes (122).

1.2.1.2. Les mécanismes moléculaires de formation des VIL au sein du MVB et devenir du MVB :

- Les mécanismes dépendants de la machinerie ESCRT

ESCRT

La machinerie ESCRT est un acteur majeur de la formation des VIL. Le complexe ESCRT est constitué des sous-complexes ESCRT-0, -I, -II, -III et de l'ATPase VPS4. ESCRT-0 se compose des protéines Hrs (hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase substrate) et STAM (signal transducing adaptor molecule) qui, grâce à leur domaine de liaison à l'ubiquitine, assurent la reconnaissance et le recrutement des protéines cargo mono- et poly-ubiquitinylées. ESCRT-0 présente également un domaine FYVE de liaison avec le PI3P de la membrane endosomale. Cette association induit la concentration des cargos et assure leur capture au niveau de microdomaines de la membrane endosomale. ESCRT-0, -I et -II agissent en coopération pour assurer le recrutement du sous-complexe ESCRT-III et de l'ATPase VPS4 (19, 118). L'hydrolyse de l'ATP médiée par VPS4 fournit l'énergie nécessaire à l'activation de la sous-unité SNF7 du sous-complexe ESCRT-III. SNF7 forme alors des filaments de restructuration membranaire en spirales, agissant comme des ressorts. Le recrutement de VPS2-VPS24 assure ensuite leur expansion et le resserrement progressif de la zone de la membrane endosomale délimitée par la spirale, imposant une courbure. VPS24 est ensuite remplacée par DID2, qui poursuit la constriction de la spirale formant un col membranaire et induisant le bourgeonnement interne de la membrane endosomale. Enfin, le recrutement de Ist-1, via DID2, achève la constriction du col membranaire qui s'allonge et finit par rompre. Ce processus de fission de la membrane endosomale conduit au détachement de la VIL dans le lumen de l'endosome. L'énergie nécessaire au déroulement de l'ensemble de ce mécanisme moléculaire est fournie par l'ATP produit par VPS4, mais aussi grâce à l'accumulation des protéines cargos (123). Le complexe ESCRT assure également le recrutement de déubiquitinasés permettant la déubiquitination par le retrait de l'ubiquitine des protéines cargos, initialement nécessaire à leur incorporation dans les VIL (124).

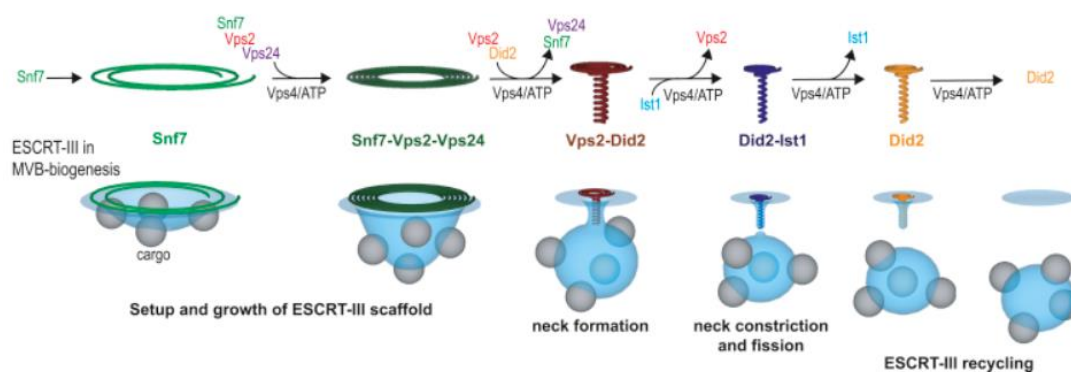


Figure 4 : Mécanisme de bourgeonnement interne et de fission de la membrane endosomale par le sous-complexe ESCRT-III, aboutissant à la formation des VIL (123)

Des mécanismes alternatifs de biogenèse des exosomes dépendants de la machinerie ESCRT existent. Cependant, ils ne nécessitent pas d'ubiquitination des cargos, leur recrutement étant médié par d'autres acteurs du processus de formation des VIL, impliquant notamment le complexe ALIX-Synténine-1.

ALIX-Synténine-1

Le plus étudié de ces mécanismes alternatifs dépendants de la machinerie ESCRT est un mécanisme dépendant du complexe ESCRT-III-ALIX-Synténine-1. La Synténine-1 présente deux domaines PDZ en tandem, lui permettant d'interagir spécifiquement avec les protéines à motif de liaison PDZ. La configuration en tandem de ses deux domaines PDZ renforce l'affinité de liaison avec les protéines cargos (125).

ALIX (ALG-2-interacting protein X) interagit avec la Synténine-1 par le biais de son domaine N-terminal. Par la suite, ALIX assure le recrutement de ESCRT-III et de VPS4 qui médie le processus de formation des VIL. La Synténine-1, par le biais de cette interaction avec ESCRT-III d'une part, et avec des protéines cargos d'autre part, assure leur recrutement au sein des VIL de manière indépendante de leur ubiquitinylation (126).

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la Synténine-1 n'affecte pas la taille et le nombre des exosomes sécrétés. SyntOFF est un inhibiteur chimique qui se lie spécifiquement au niveau de son domaine PDZ2, à la manière d'un antagoniste. En revanche, l'inhibition de la Synténine-1 altère la composition des exosomes. Cette étude confirme que la Synténine-1 n'est pas directement impliquée dans le mécanisme moléculaire d'invagination de la membrane endosomale formant les VIL, mais est indispensable au recrutement de cargos spécifiques, et donc à la production d'un type d'exosomes au contenu particulièrement enrichi en Synténine-1 et en cargos associés (127).

L'activité du complexe ALIX-Synténine-1 dans la biogenèse des exosomes est finement régulée par la phosphorylation ou le clivage de la Synténine-1. De plus, la petite GTPase Arf6 et son effecteur, la phospholipase D2 (PLD2), contrôlent la formation des VIL associées au complexe ALIX-Synténine-1 en interagissant directement avec la Synténine-1 (128).

De nombreux autres mécanismes non canoniques de formation des VIL dépendants de la machinerie ESCRT sont impliqués dans la biogenèse des exosomes. La tyrosine phosphatase HD-PTP (his-domain-containing protein tyrosine phosphatase) (HD-PTP/PTPN23, non-receptor-type protein tyrosine phosphatase 23) peut participer à la constitution du complexe ESCRT en assurant l'association entre les sous-complexes ESCRT-0 et ESCRT-III, sans le recrutement des autres sous-complexes ESCRT-I et ESCRT-II. Enfin, d'autres composants des sous-complexes ESCRT peuvent interagir directement avec des protéines cargos, comme TSG101 (tumor susceptibility gene 101) du sous-complexe ESCRT-I, qui par l'intermédiaire de son domaine ubiquitine, recrute notamment les protéines cargos galectin-3 et BAG6 (12, 118, 129-131).

- Les mécanismes indépendants de la machinerie ESCRT

Les exosomes sont particulièrement enrichis en lipides, qui s'organisent en microdomaines semblables à des rafts lipidiques, et sont grandement impliqués dans les mécanismes de biogenèse des VIL indépendants de la machinerie ESCRT.

Tétraspaines

Les tétraspaines constituent une catégorie de molécules particulièrement enrichies dans les microdomaines lipidiques de la membrane endosomale. Les tétraspaines font partie des marqueurs spécifiques des exosomes et participent à leur identification. Ces glycoprotéines possèdent quatre domaines transmembranaires et un domaine cytoplasmique spécifique leur conférant une spécificité d'interaction et de fonctions (132). Elles sont notamment impliquées dans l'adhésion, la motilité et l'invasion cellulaires, ainsi que dans les mécanismes de fusion membranaire. De plus, les tétraspaines ont une forte propension à s'associer entre elles, formant des microdomaines enrichis en tétraspaines, mais aussi à interagir avec diverses protéines susceptibles de devenir des cargos incorporés dans les VIL (133, 134).

CD63 est la tétraspaine la plus exprimée au sein du système endosomal, en particulier à la membrane de l'endosome tardif, du MVB et du lysosome, lui valant son appellation de LAMP3. L'analyse précise de la localisation de CD63 au sein du système endosomal révèle une localisation majoritaire à la membrane des VIL, où CD63 aurait été démontrée comme étant sept fois plus enrichie (135). Cette localisation suggère l'implication de CD63 dans les processus de formation des VIL (136). Par ailleurs, la perte de fonction de CD63 diminue significativement la biogenèse des exosomes par diminution de la formation des VIL, confirmant que CD63 joue un rôle essentiel dans ce processus. De plus, le mécanisme de formation des VIL dépendant de CD63 s'avère complètement indépendant de la machinerie ESCRT (137).

La balance entre les mécanismes de formation des VIL dépendants versus indépendants du complexe ESCRT détermine le devenir des protéines cargos incorporées dans les VIL. Notamment, le recrutement de la protéine mélanocytaire PMEL (amyloidogenic pigment cell-specific type I integral membrane protein) dans les VIL est médié par l'interaction directe de CD63 avec cette protéine. Tandis que la machinerie ESCRT envoie PMEL à la dégradation, le mécanisme de formation des VIL et de recrutement de PMEL dépendant de CD63 assure sa sécrétion exosomale par les cellules MNT-1 issues d'un mélanome cutané. Les mécanismes de formation des VIL participent donc à la détermination du devenir des VIL ainsi formées, entre sécrétion et dégradation (137). D'autres cargos peuvent aussi être incorporés dans les exosomes par le biais du mécanisme dépendant de CD63, comme la protéine oncogène LMP1 (latent membrane protein 1) et le facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) (118).

Les autres tétraspanines retrouvées dans les exosomes, et également considérées comme des marqueurs caractéristiques de cette catégorie de vésicules, en particulier CD9 et CD81, pourraient être impliquées dans la formation des VIL et le recrutement de cargos spécifiques. Cette hypothèse est renforcée par la présence de CD9 et CD81 au sein des microdomaines enrichis en CD63 à l'origine des VIL. Une possible coopération entre ces différentes tétraspanines est envisageable mais les mécanismes moléculaires exacts de formation des VIL médiés par les tétraspanines restent à décrypter. Une investigation plus poussée de leur nécessité dans la formation des VIL et de leur indépendance vis-à-vis du complexe ESCRT est également requise (136).

Par ailleurs, l'interaction directe de la tétraspanine avec le domaine PDZ1 de la Synténine-1 est décrite au niveau de la membrane plasmique, mais aussi, au niveau de l'endosome et des exosomes (138). CD63-Synténine-1, elle-même associée à ALIX, forme le complexe CD63-Synténine-1-ALIX décrit pour son implication dans la régulation du transport endosomal du Papillomavirus (HPV16). L'existence du complexe endosomal CD63-Synténine-1-ALIX renforce la nécessité d'approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires exacts du processus de formation des VIL impliquant CD63 (139).

Enfin, d'autres protéines constitutives des microdomaines enrichis en lipides sont impliquées dans la formation des VIL, notamment le cholestérol, les céramides et les flotillines, dont les mécanismes moléculaires associés restent à préciser (12, 118).

Sphingosine-1-phosphate (S1P)

Le mécanisme de biogenèse des exosomes dépendant des sphingolipides, en particulier de la signalisation des récepteurs (S1PR) de la sphingosine-1-phosphate (S1P), a été bien décrit. L'activation constitutive de S1P/S1PR au niveau du MVB est responsable d'une dissociation des sous-unités G $\beta\gamma$ et G α i de la grande protéine G. Cette dissociation, révélée par la technique de FRET (« Förster resonance energy transfer »), permet à la sous-unité G $\beta\gamma$ de transduire le signal par interaction avec les facteurs d'échange nucléotidiques GEF, PLEKHG2 et P-Rex1. Cette signalisation conduit à l'activation des petites GTPases Rho, Cdc42 et Rac1, à l'origine d'une réorganisation du cytosquelette d'actine et de la polymérisation de nouveaux filaments. Ces réarrangements du réseau d'actine à la membrane endosomale conduisent à l'invagination de cette dernière et à la formation des VIL. En parallèle, ce mécanisme est impliqué dans le recrutement de divers cargos à la membrane du MVB au niveau du site d'invagination, assurant leur incorporation au sein des VIL (140).

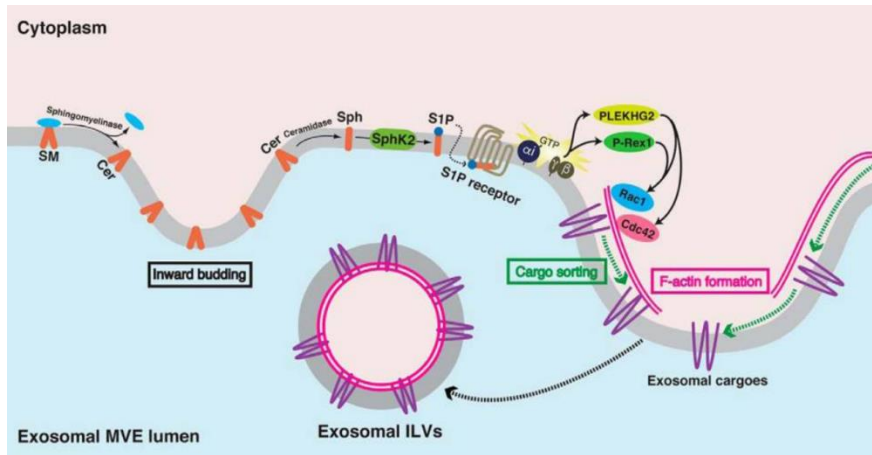


Figure 5 : Mécanisme de biogenèse des VIL dépendant de la signalisation S1P/S1PR (140)

Il existe donc une coopération entre les mécanismes de biogenèse dépendants et indépendants de la machinerie ESCRT, qui peuvent intervenir de manière concomitante ou séquentielle, et assurer le chargement de cargos spécifiques dans les VIL. Leur contribution peut varier en fonction du type de cargos et du type cellulaire et conditionne grandement le devenir des VIL entre dégradation et sécrétion exosomale (12).

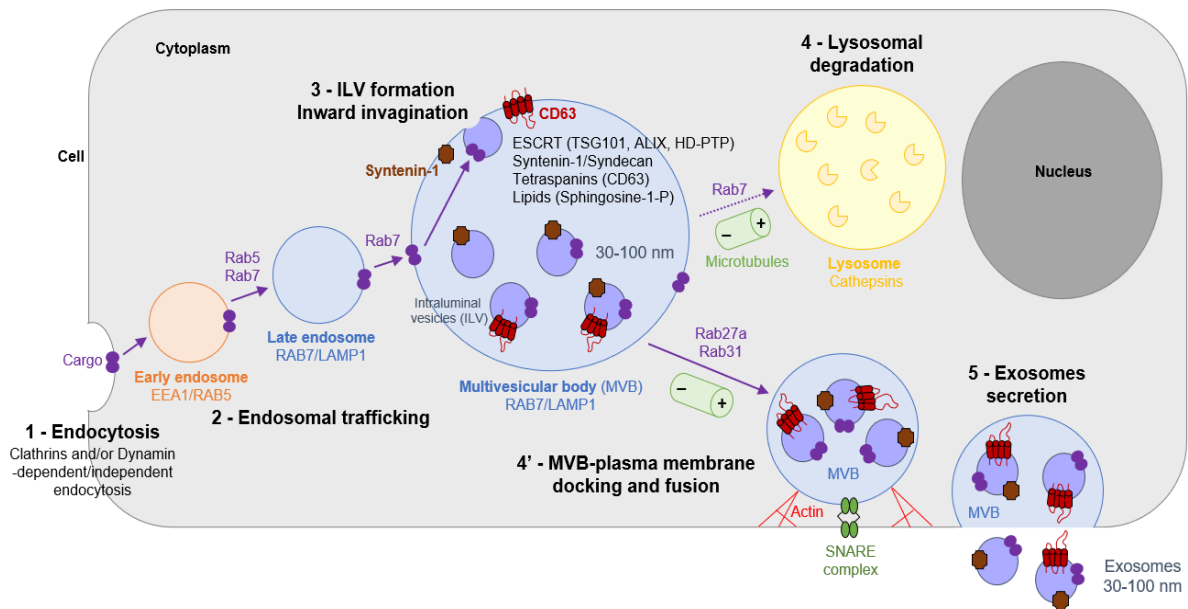


Figure 6 : Représentation schématique de la biogenèse des exosomes

1.2.1.3. Les mécanismes moléculaires de formation des VIL en contexte apoptotique

Le contexte apoptotique de la sécrétion des exosomes apoptotiques ou apo-exosomes suggère l'existence de spécificités dans leur mécanisme de biogenèse, en particulier l'implication d'acteurs moléculaires spécifiques de la signalisation apoptotique, les caspases. En l'état actuel des connaissances, nous avons répertorié uniquement deux groupes de recherche, S.J. Park et

al. et D. Beillevaire et al., qui se sont attachés à décrypter les mécanismes moléculaires précis de la biogenèse des apo-exosomes et qui en font une description détaillée.

Sphingosine-1-phosphate (S1P)

Le mécanisme de biogenèse des exosomes dépendant des sphingolipides, présenté précédemment dans le cadre de la biogenèse des exosomes sécrétés par les cellules viables, semble également être impliqué dans la production des **exosomes en contexte apoptotique**. L'étude de S.J. Park et al. est une des très rares études portant sur la compréhension des mécanismes moléculaires de biogenèse des exosomes apoptotiques ou apo-exosomes, qui propose un mécanisme de biogenèse particulièrement bien détaillé et pertinent au vu de son implication dans les mécanismes de biogenèse des exosomes non apoptotiques. Cette étude suggère donc un processus de production des apo-exosomes impliquant des acteurs moléculaires communs à certains de ceux des exosomes produits en contexte non apoptotique (22).

À la suite du traitement avec l'inducteur de l'apoptose Staurosporine, le mécanisme de formation des apo-exosomes débute par la production de S1P par la sphingosine kinase 2 (SPHK2) qui phosphoryle la sphingosine. La S1P est ensuite transloquée hors de la membrane et se fixe au niveau de ses récepteurs en extracellulaire, en particulier les récepteurs S1PR1 et S1PR3, conduisant à leur activation. La signalisation S1P/S1PR, par le biais de la sous-unité G $\beta\gamma$ de la grande protéine G, induit alors l'activation des protéines de la famille des GTPases Rac1, Cdc42, et RhoA. Les modulations du cytosquelette d'actine qui en découlent aboutissent à une endocytose et la formation d'endosomes exprimant CD63 et S1P/S1PR. L'endocytose et l'initiation du trafic endosomal sont donc assurées par la signalisation S1P/S1PR au niveau de la membrane plasmique, au début de l'apoptose (22).

L'analyse en microscopie du trafic intracellulaire des marqueurs de l'endosome CD63 et S1PR permet d'observer l'évolution des endosomes de la membrane plasmique vers la région péri-nucléaire. Ces mouvements centripètes se font le long du réseau d'actine et s'accompagnent de la maturation des endosomes précoces en MVB. Quatre heures après le début de l'apoptose, les MVB contiennent un grand nombre de VIL (22).

Cette analyse en microscopie révèle que CD63 reste majoritairement localisée à la membrane du MVB, tandis que les S1PR se retrouvent dans le lumen du MVB. Plus précisément, le complexe S1P/S1PR est exprimé à la membrane des apo-exosomes et apparaît comme leur marqueur spécifique. L'incorporation des S1PR dans les apo-exosomes se produit donc lors de leur formation sous forme de VIL au sein du MVB et suggère l'implication des S1PR en tant qu'acteurs de cette formation. De plus, la perte de fonction d'ALIX (ARN interférent), protéine intermédiaire entre cargos et complexe ESCRT, ne perturbe pas la biogenèse des apo-exosomes, supposant qu'il s'agit d'un mécanisme indépendant de la machinerie ESCRT. L'ensemble de ces données convergent vers un mécanisme de biogenèse des apo-exosomes

dépendant de la signalisation S1P/S1PR, aussi bien lors de l'endocytose au début de l'apoptose, que lors de la biogenèse des VIL au cours de l'apoptose (22).

Caspases

Toutefois, l'étude de S.J. Park et al., mentionnée précédemment, suggère une particularité associée à la biogenèse des apo-exosomes, qui semble résider dans l'étape de fusion du MVB avec la membrane plasmique de la cellule, plutôt que dans les mécanismes de formation des VIL (22).

L'apoptose peut être déclenchée de manière endogène, par un stress génotoxique, ou exogène, par activation de récepteurs de mort à la surface cellulaire, conduisant à l'élimination de la cellule. Dans ces deux cas, une classe de protéases, correspondant aux caspases, est activée et orchestre le phénomène de mort cellulaire. Ces enzymes semblent jouer un rôle dans la genèse des apo-exosomes, en plus de leur implication dans la formation des microvésicules et des corps apoptotiques, que sera présentée par la suite (22, 141).

En effet, cette même étude démontre que le MVB évolue en direction de la membrane plasmique de la cellule avec laquelle il fusionne, libérant ainsi les apo-exosomes dans le milieu extracellulaire de manière dépendante des caspases. La perte de fonction de la protéine Rab27a, impliquée dans la fusion du MVB à la membrane plasmique en contexte non apoptotique, n'a pas d'effet. En revanche, la perte de fonction (ARN interférent) des caspases -3 et -9 diminue significativement la production des apo-exosomes, suggérant le rôle des caspases dans le processus de biogenèse des apo-exosomes (22).

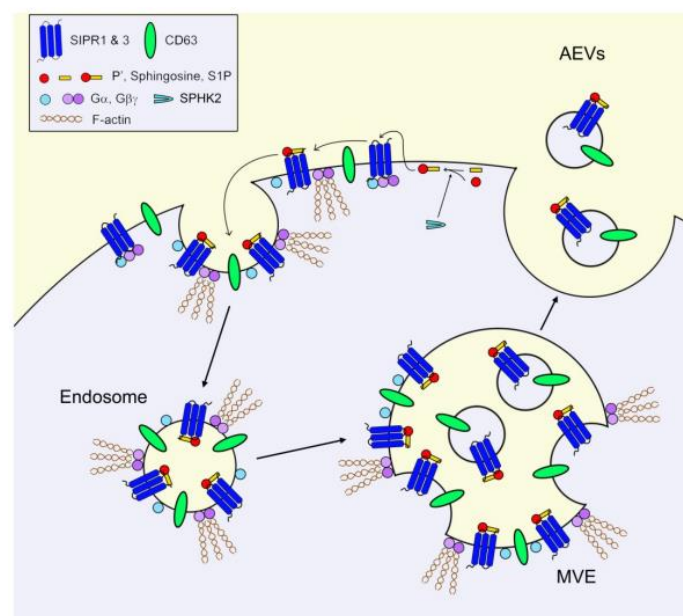


Figure 7 : Représentation du mécanisme de biogenèse des apo-exosomes dépendant de la signalisation S1P/S1PR d'après l'étude de S.J. Park et al. (22)

Cette dernière donnée fait écho aux travaux de D. Beillevaire et al., selon lesquels la fusion du compartiment endolysosomal avec la membrane plasmique, responsable de la libération des apo-exosomes en extracellulaire, est médiée par la caspase-3 (141). A nouveau, il est important de noter que seuls les travaux de ces deux groupes de recherche s'attachent à décrire ces processus et suggèrent une fonction des caspases dans le mécanisme de biogenèse des apo-exosomes.

Par le biais d'analyses par microscopies électronique et confocale combinées, cette étude fournit une description précise du processus de biogenèse des apo-exosomes au sein du système endolysosomal. L'apoptose des cellules endothéliales HUVEC est induite par le stress imposé par la « starvation » en sérum des cellules, alors en manque de nutriment (déprivation en sérum). Deux heures après le début de la « starvation », des phénomènes de fusions entre les MVB, les lysosomes et les autophagosomes sont observés, donnant naissance à des compartiments appelés autolysosomes. La place occupée par ces autolysosomes au sein du cytoplasme augmente progressivement. Trois heures après le début de la « starvation », les autolysosomes, de 2 à 4 µm de diamètre, occupent presque la totalité du cytoplasme et compriment le noyau de la cellule. Des processus de fusion entre les autolysosomes et des invaginations internes de la membrane de ces compartiments sont clairement observables. Ces événements sont à l'origine de la formation des VIL, de diamètre compris entre 50 et 150 nm. Les autolysosomes, avec pour marqueur spécifique LAMP2, apparaissent donc comme le site de biogenèse des apo-exosomes (141).

L'inhibition de l'autophagie par une perte de fonction (ARN interférent) de ATG7 ou par le biais d'inhibiteurs chimiques (wortmannin et bafilomycin) ne perturbe pas la biogenèse des apo-exosomes. En revanche, comme mentionné précédemment, l'inhibition de la caspase-3 est associée à un blocage de leur sécrétion. Cette donnée semble confirmer le rôle essentiel de la caspase-3 dans les processus d'interaction et de fusion des autolysosomes avec la membrane plasmique de la cellule, nécessaires à la sécrétion des apo-exosomes en extracellulaire (141). Cependant, la caspase-3 ne serait pas impliquée dans les processus de fusion entre les différents compartiments du système endolysosomal donnant naissance aux autolysosomes. Les acteurs moléculaires de ces mécanismes de fusions inter-compartiments restent donc à identifier (141).

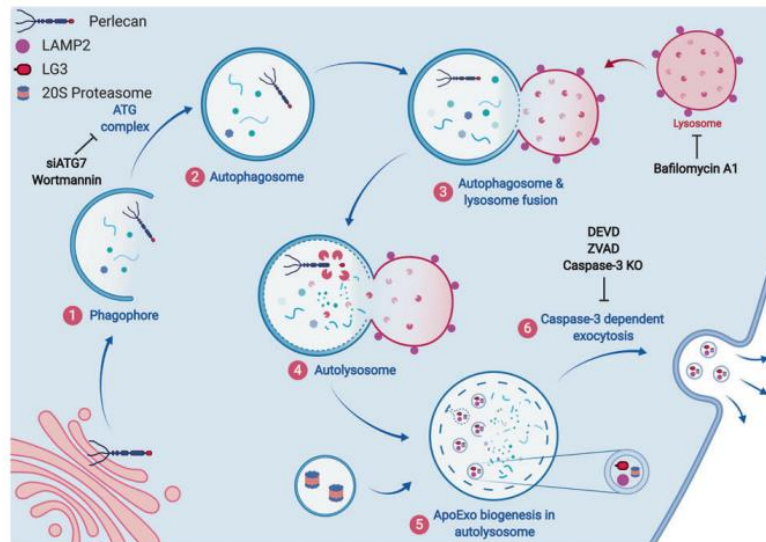


Figure 8 : Représentation des étapes conduisant à la biogenèse des apo-exosomes au sein du système endolysosomal (141)

I.2.1.4. La régulation de la genèse des exosomes :

La genèse des exosomes est régulée par la situation physiologique ou pathologique, la nature de la cellule sécrétrice et en particulier le contexte de sécrétion, c'est-à-dire un contexte viable ou apoptotique. En effet, si toutes les cellules sont capables de sécréter des exosomes, les cellules apoptotiques sécrètent des quantités plus importantes d'exosomes et autres VE apoptotiques, assurant le démantèlement de la cellule mourante (10). De plus, si les exosomes sécrétés en contexte apoptotique partagent des caractéristiques morphologiques communes avec les exosomes sécrétés par les cellules viables, ils présentent des spécificités de contenu, de fonction et de mécanisme de biogenèse (22, 141). Ces données suggèrent que le contexte de sécrétion et les acteurs moléculaires associés sont des paramètres déterminants dans la régulation du type et de la quantité d'exosomes générés.

- En contexte viable

Les mécanismes de biogenèse et le transport endosomal intracellulaire constituent les processus de régulation de la genèse des exosomes. Comme nous l'avons présenté précédemment, l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus conditionnent le devenir des cargos au sein du système endolysosomal entre recyclage, dégradation et sécrétion exosomale, et par conséquent régulent la sécrétion des exosomes (12, 23, 113, 116).

Les mécanismes moléculaires responsables de la formation des VIL au sein du MVB déterminent l'incorporation des cargos dans ces VIL, ainsi que leur devenir entre dégradation et sécrétion. Les mécanismes qui favorisent l'envoi du MVB à la dégradation par fusion avec le lysosome, en particulier les mécanismes de biogenèse dépendants de la machinerie ESCRT et de l'ubiquitination des cargos, inhibent la sécrétion des exosomes (12, 114). En revanche, les mécanismes de biogenèse indépendants de la machinerie ESCRT semblent promouvoir la fusion

du MVB avec la membrane plasmique, et ainsi modulent positivement la sécrétion des exosomes (12). La formation des VIL au sein du MVB est donc un prérequis à la production/sécrétion des exosomes et la balance entre les mécanismes de formation des VIL pro-dégradation ou pro-sécrétion régule leur genèse (23, 80).

De plus, les acteurs moléculaires du transport endosomal, en particulier les protéines de la famille des petites GTPases Rab, sont susceptibles d'orienter le transport du MVB et de son contenu en direction du lysosome conduisant à sa dégradation, ou en direction de la membrane plasmique à l'origine de la sécrétion des exosomes. Les acteurs moléculaires du transport pro-dégradatif, en particulier Rab7, contribuent donc à la régulation négative de la sécrétion des exosomes, tandis que les acteurs moléculaires du transport pro-sécrétion, notamment Rab31, favorisent la production/sécrétion des exosomes (116, 117, 142). La coordination des mécanismes de transport intracellulaire constitue donc un autre processus de régulation de la genèse des exosomes.

Enfin, la fusion du MVB avec la membrane plasmique, qui concrétise la genèse des exosomes, est également un phénomène régulé par les acteurs moléculaires qu'il implique. Notamment, les protéines Rab27a et Rab27b permettent l'arrimage du MVB à la membrane plasmique, modulant positivement la fusion du MVB avec la membrane plasmique et la sécrétion des exosomes (12). L'activation de la machinerie SNARE, responsable du mécanisme moléculaire de fusion du MVB avec la membrane plasmique, est un autre mécanisme moléculaire activateur de la genèse des exosomes (120, 122).

- En contexte apoptotique

La régulation de la genèse des exosomes en contexte apoptotique est également médiée par les mécanismes moléculaires de biogenèse et de transport intracellulaire. Cependant, l'apoptose suppose des spécificités par rapport au contexte viable, d'autant qu'elle est associée à une augmentation de la genèse des exosomes (10). La modulation positive de leur production/sécrétion en contexte apoptotique suggère l'activation d'acteurs moléculaires spécifiques et suppose le déclenchement de ces mécanismes par le processus apoptotique. A ce jour, la seule spécificité mise en évidence, qui pourrait expliquer que la signalisation apoptotique promeut la genèse des apo-exosomes, est l'implication des effecteurs principaux de cette signalisation, les caspases, dans leur mécanisme de production/sécrétion. Comme présenté précédemment, seules deux études mentionnent l'implication des caspases, en particulier des caspases -3 et -9. Leur rôle exact dans le mécanisme de biogenèse des apo-exosomes est donc à préciser (22, 141).

Par ailleurs, les caspases pourraient être impliquées dans la régulation du transport intracellulaire endosomal. En effet, les caspases sont des protéases responsables du clivage de nombreuses cibles intracellulaires, provoquant leur inactivation et leur dégradation. Lors de l'apoptose, l'acteur

du transport intracellulaire pro-dégradatif, ENTRI, constitue par exemple une cible du clivage des caspases effectrices. Le clivage de ENTRI induit une inhibition du transport du MVB vers le lysosome, et donc de la dégradation. Etant donné la balance entre dégradation et sécrétion, ce clivage serait susceptible de promouvoir la prise en charge du MVB par les acteurs du transport intracellulaire pro-sécrétion, favorisant la genèse des apo-exosomes (143). D'autres clivages médiés par les caspases pourraient contribuer à la modulation positive de la production des apo-exosomes, cependant ces mécanismes restent à identifier.

Enfin, l'apoptose peut être déclenchée par différents inducteurs de mort, tels que les récepteurs de mort, des composés chimiques ou des stress génotoxiques. Le mode d'induction de l'apoptose semble être un autre paramètre déterminant dans la modulation de la genèse des exosomes apoptotiques (22, 141, 144). Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne réalise une analyse comparative précise des éventuelles modulations de la genèse des apo-exosomes en fonction de l'inducteur de l'apoptose utilisé.

Des approfondissements sont donc nécessaires afin de comprendre l'étendue des régulations de la genèse des apo-exosomes médiées par les effecteurs de la signalisation apoptotique et par l'activation ou l'inhibition d'autres potentiels acteurs moléculaires en contexte apoptotique.

1.2.2. La biogenèse des microvésicules et des corps apoptotiques

Les microvésicules sont produites par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule, suivi par un phénomène de fusion des membranes, conduisant à leur relargage dans le milieu.

Le processus de bourgeonnement peut être médié par au moins deux mécanismes différents : des réarrangements du cytosquelette et/ou par des remaniements des lipides composant la membrane (20, 145, 146).

Le processus de **réarrangement du cytosquelette** implique la signalisation dépendante de la petite GTPase RhoA. L'activation de RhoA induit celle de son effecteur, la protéine kinase ROCK I (Rho-associated coiled-coil containing kinases I). ROCK I est connue pour son implication dans de nombreux processus morphologiques et de mouvements cellulaires, par son action au niveau du cytosquelette. En particulier, ROCK I inhibe la dépolymérisation des filaments d'actine en induisant la phosphorylation et l'activation de la kinase LIM (LIMK). LIMK phosphoryle à son tour la protéine déstabilisante de l'actine, ADF/cofiline, inhibant ainsi son activité de dépolymérisation. Le réseau d'actine ainsi stabilisé génère des forces mécaniques s'exerçant sous la membrane plasmique. Ces forces provoquent son bourgeonnement externe, conduisant à la formation de microvésicules et leur libération dans le milieu extracellulaire (12, 20, 145).

S'agissant des processus impliquant les **remaniements de lipides**, l'établissement de microdomaines enrichis en cholestérol au niveau de la membrane plasmique, ainsi qu'une asymétrie dans la présence de ces lipides, favorisent la production des microvésicules. Les influx calciques induisent des perturbations dans l'asymétrie des phospholipides membranaires par

l'intermédiaire de l'activation de la scramblase et de l'ATPase flippase. Ces protéines assurent la translocation des phospholipides chargés négativement entre les deux feuillets de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, conduisant notamment à une exposition à la surface des phosphatidylsérines originaires de la couche interne de la bicouche lipidique. Ces perturbations causent des déformations physiques de la membrane, accompagnées de restructuration du cytosquelette d'actine sous-jacent, provoquant le bourgeonnement externe de la membrane à l'origine des microvésicules (146).

Les acteurs moléculaires de la machinerie ESCRT, mentionnés précédemment dans le contexte de la biogenèse des VIL, sont également responsables d'un mécanisme de formation des microvésicules. Lorsque la machinerie ESCRT intervient au niveau de la membrane plasmique dans la biogenèse des microvésicules, le sous-complexe ESCRT-0 est absent et elle se compose initialement des sous-complexes ESCRT-I et ESCRT-II. ESCRT-I et II assurent le recrutement du sous-complexe ESCRT-III, incluant alors ALIX et l'ATPase VPS4. L'action coordonnée de ces sous-complexes conduit à la courbure externe de la membrane et au resserrement des membranes constituant le col de la courbure. La constriction progressive du col aboutit à la fusion des membranes et provoque ainsi la dissociation de la microvésicule de la membrane plasmique (147).

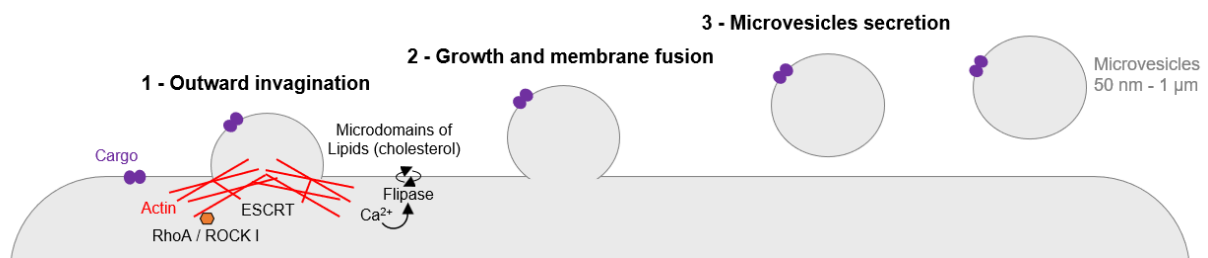


Figure 9 : Représentation du processus de biogenèse des microvésicules

Les microvésicules apoptotiques, comme les corps apoptotiques, sécrétés quant à eux exclusivement au cours de l'apoptose, sont également générés par le biais de ces processus de bourgeonnement externe de la membrane plasmique. Cependant, la spécificité du contexte apoptotique réside, au même titre que lors de la biogenèse des apo-exosomes, dans l'activation des caspases. En particulier, la caspase-3 est responsable du clivage de ROCK I au niveau de sa séquence DETD1113/G, éliminant son domaine C-terminal d'auto-inhibition. La perte de ce domaine d'auto-régulation négative conduit à une activité kinase constitutive de ROCK I, à l'origine de la phosphorylation accrue de la Myosin light chain (MLC) et au remodelage des réseaux de microtubules et d'actine. L'activation de la caspase-3 engendre donc une activité accrue de bourgeonnement de la membrane plasmique en contexte apoptotique, générant des microvésicules et des corps apoptotiques en quantité et taille importantes (10, 148, 149).

I.3. Les modes d'action des VE aux cellules réceptrices

Les VE sécrétées dans le milieu extracellulaire, selon les modes de production évoqués précédemment, peuvent avoir un mode de dispersion locale en modulant le phénotype des cellules dans l'environnement proche de la cellule sécrétrice. Elles peuvent également avoir un mode de dispersion globale en circulant via les fluides de l'organisme, notamment le sang, le liquide céphalo-rachidien et la salive, en direction des cellules réceptrices. Ainsi, les VE assurent la coordination cellulaire pour la mise en place de réponses adaptatives à l'échelle de l'organisme (150, 151).

Du fait de cette circulation globale, le ciblage des cellules cibles par les VE est, en général, un processus non sélectif. Cependant, les capacités d'absorption des cellules diffèrent, pouvant expliquer l'accumulation spécifique des VE dérivées de cellules tumorales en particulier dans certains organes (151). De plus, certaines protéines sont caractéristiques de populations d'exosomes spécifiquement dirigés vers un type cellulaire. Par exemple, la tétraspanine CD63 est exprimée à la surface d'exosomes sécrétés par les neuroblastes ciblant les dendrites neuronales, tandis que les exosomes dépourvus de CD63 ciblent préférentiellement les cellules gliales (152).

Une fois à proximité de la cellule réceptrice, les VE ont deux modes d'action pour entrer en contact avec la cellule et transmettre un signal : l'interaction via les protéines transmembranaires et/ou la fusion avec la membrane plasmique conduisant à la libération de molécules bioactives à l'intérieur de la cellule cible. Les conditions qui déterminent la balance entre fusion et internalisation par endocytose restent encore à élucider (153).

L'interaction via les protéines transmembranaires peut se faire par le biais des ligands exprimés à la surface des VE, leur permettant d'interagir avec des récepteurs transmembranaires localisés à la surface des cellules réceptrices, provoquant l'induction de la signalisation associée. Les complexes CMH/antigènes et les ligands TNF (tumor necrosis factor) des récepteurs de mort cellulaire sont exprimés à la surface des exosomes et participent à ce processus d'interaction entre VE et cellules réceptrices. Dans ce contexte, l'action des VE sur la cellule réceptrice se fait en surface (153, 154).

D'autres interactions protéines-protéines favorisent l'internalisation des VE au sein de la cellule réceptrice. Différentes lectines et molécules d'adhésion facilitent l'endocytose des VE et différents mécanismes d'endocytose interviennent, tels que la macropinocytose, la phagocytose, l'endocytose médiée par les clathrines, les cavéolines ou l'endocytose indépendante des clathrines et cavéolines (155-158). L'internalisation des VE se fait également au niveau de microdomaines enrichis en lipides, notamment les sphingolipides et le cholestérol (159). Dans ce contexte, l'action des VE se fait à la suite de son internalisation, qui lui permet de transmettre son contenu à la cellule réceptrice (160).

Les VE peuvent également transmettre leur contenu aux cellules réceptrices par son relargage dans le milieu intracellulaire à la suite de **la fusion** des VE avec la membrane plasmique de la cellule. Ce processus, proche de l'endocytose, semble être assuré par des remaniements des lipides membranaires, favorisant la concentration de lipides fusogéniques, tels que l'acide phosphatidique et le bis(monoacylglycero)phosphate, tous deux présents à la membrane des VE (161, 162).

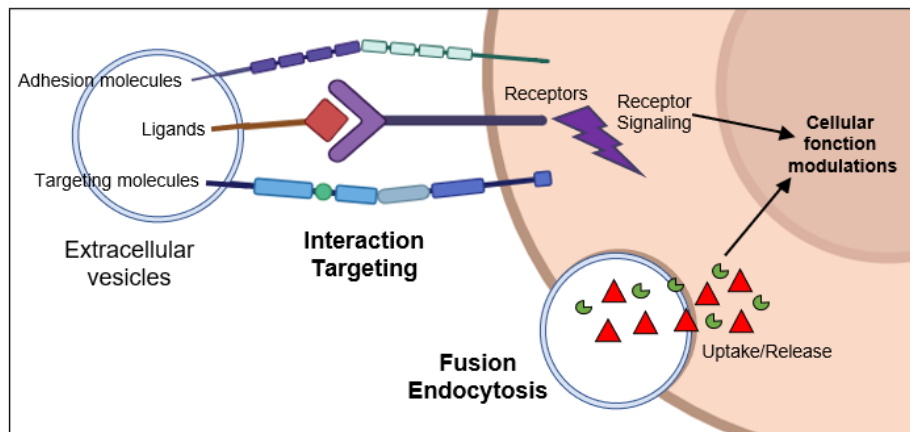


Figure 10 : Deux modes d'action des VE au niveau de la cellule réceptrice : l'interaction via les protéines transmembranaires ou la fusion avec la membrane plasmique

I.4. Le devenir intracellulaire des VE

Le devenir intracellulaire des VE internalisées correspond à la voie classique de transport endosomal. En effet, elles évoluent depuis la membrane plasmique vers le compartiment endosomal précoce, puis tardif. Leur transport intracellulaire s'achève par la fusion de l'endosome tardif avec le lysosome, provoquant leur dégradation, ainsi que celle de leur contenu. Dans ce contexte, les molécules internalisées par le biais des VE ne contribuent pas à l'induction d'une réponse cellulaire (163, 164). Cependant, de nombreuses études démontrent que les VE sont susceptibles d'échapper à la dégradation lysosomale et sont responsables de modulations fonctionnelles de la cellule réceptrice (165, 166). L'acidification progressive du système endosomal semble favoriser l'activation des cargos contenus dans les VE. Par exemple, le facteur de croissance TGF β 1 (transforming growth factor- β) de la superfamille des cytokines du TGF β est activé au sein de l'environnement endosomal acide et induit des modulations phénotypiques de la cellule réceptrice des exosomes chargés en TGF β 1, en particulier l'acquisition d'un phénotype migratoire. La localisation endosomale de TGF β 1 exosomal semble assurer le maintien de sa signalisation, à l'inverse de la localisation cytoplasmique de TGF β 1 libre (167).

Certains organites cellulaires constituent également des cibles du transport des VE et de leurs cargos. Les exosomes transportent des ARNs messagers et peuvent les transférer au RE, en particulier le RE granuleux associé aux ribosomes, afin de permettre leur traduction, et par

conséquent, provoquer des modulations d'expression protéique rapides au sein de la cellule réceptrice (168, 169).

Le réticulum nucléoplasmique est un autre compartiment intracellulaire susceptible de réceptionner des exosomes, ainsi que leur contenu. Le réticulum nucléoplasmique présente des invaginations nucléaires liant l'enveloppe nucléaire à l'endosome tardif. Ce compartiment est une localisation propice au transfert nucléaire du contenu des exosomes, pouvant alors induire des modulations génétiques rapides au sein de la cellule réceptrice (170, 171).

Les cargos peuvent également être redirigés vers le TGN via un transport rétrograde, puis recyclés par retour à la membrane cellulaire, relargués dans le cytoplasme par diffusion passive depuis les VE, ou incorporés dans la membrane endosomale par fusion des VE avec cette dernière (160, 172-175). D'autre part, les cargos peuvent être recyclés vers la membrane plasmique depuis l'endosome précoce ou l'endosome de recyclage, et participer au déclenchement et à la transduction de signalisations à partir de la membrane cellulaire (94). De multiples alternatives existent donc à la dégradation des VE et de leurs cargos, leur permettant d'assurer leur fonction biologique au sein de la cellule réceptrice.

Par ailleurs, la fusion des VE avec la membrane plasmique de la cellule induit un transfert des molécules depuis la surface des VE vers la surface de la cellule réceptrice. Ces protéines transmembranaires, alors exprimées à la surface de la cellule réceptrice, sont susceptibles de contribuer à la transduction de signaux déclenchés à la membrane plasmique, et par conséquent aux modulations du fonctionnement cellulaire (22).

Les VE peuvent donc suivre de multiples voies de transport intracellulaire, évitant la dégradation de leur contenu afin de contribuer à la signalisation fonctionnelle. Le devenir intracellulaire des VE est déterminé par le type cellulaire et leur composition en cargos (176).

I.5. La composition des différentes VE : spécificité des marqueurs et diversité des cargos

D'un point de vue structural, les VE sont délimitées par une bicouche lipidique. A leur surface et au sein de leur lumen, une grande diversité de molécules cargos peut être retrouvée, comme des protéines, des acides nucléiques et des lipides (12, 118).

Les différents mécanismes de biogenèse, ainsi que le type cellulaire, contribuent à l'incorporation de molécules spécifiques à chacune des catégories de VE. L'expression spécifique de ces molécules est à l'origine de leur fonction et du ciblage des cellules réceptrices. La détection de ces marqueurs, qui peut être complétée par des analyses omiques, contribue également à leur identification en termes de mécanismes de genèse (exosomes, microvésicules), mais également de leur tissu d'origine (12, 118).

I.5.1. La composition des exosomes et apo-exosomes

I.5.1.1. La composition des exosomes

La composition des exosomes est caractérisée par une très forte hétérogénéité. Elle est conditionnée par le contexte physiologie ou pathologique, les mécanismes de biogenèse et le type cellulaire dont les exosomes sont originaires. En effet, les exosomes héritent de certaines molécules spécifiques en fonction de ces paramètres, pouvant être utilisées comme marqueurs spécifiques d'une sous-population d'exosomes. Ces marqueurs ne constituent pas des marqueurs moléculaires généraux des exosomes. En revanche, ils sont des indicateurs de leur origine cellulaire, du contexte et de leurs mécanismes de biogenèse. La base de données en ligne ExoCarta ressource l'intégralité des protéines, acides nucléiques et lipides à ce jour identifiés dans des préparations exosomales spécifiques. Elle fournit également une aide précieuse pour l'identification des exosomes sur la base de leurs cargos.

Les exosomes contiennent donc un ensemble de molécules très variables qui ne sont pas considérées comme des marqueurs de cette catégorie de VE. Cependant, les exosomes se caractérisent également par la présence de molécules spécifiques de cette catégorie de VE, contribuant à leur identification en tant qu'exosome. Différents acteurs moléculaires qui contribuent à leur formation se retrouvent spécifiquement présents dans les exosomes. C'est le cas de la protéine du sous-complexe ESCRT-I TSG101 (130). De la même manière, ALIX et Synténine-1, responsables d'un mécanisme alternatif de biogenèse des exosomes dépendant de la machinerie ESCRT, sont spécifiquement retrouvées (126). De plus, une nouvelle étude démontre la forte présence de protéines à domaine PDZ, en plus de la Synténine-1, qui régulent l'incorporation d'une grande diversité de molécules dans les exosomes, notamment des protéines de transport Syndécan et des tétraspanines (16). Plusieurs tétraspanines, en particulier CD63, CD9 et CD81, sont enrichies à la surface des exosomes, en tant qu'acteurs de la formation des VIL et molécules spécifiques de l'endosome tardif, d'où sont issus les exosomes (136, 137). La membrane des exosomes se caractérise également par un fort enrichissement en lipides, en particulier en cholestérol, sphingolipides et céramides. Parmi ces lipides, la sphingosine-1-phosphate et l'acide lysophosphatidique sont majoritairement présents à la membrane exosomale (177). L'ensemble de ces protéines constitue des marqueurs caractéristiques des exosomes et leur présence dans des VE les définit comme appartenant à cette catégorie.

Les acteurs moléculaires de la biogenèse des exosomes sont responsables de l'incorporation sélective de certains cargos dans les exosomes, lors de la formation des VIL. Par conséquent, ces molécules se retrouvent en quantité significative dans les exosomes.

Le complexe ESCRT et les tétraspanines sont notamment impliqués dans le chargement de GTPases, telles que Arf6, responsable de la régulation de la formation des VIL (178). Parmi les GTPases, sont également retrouvées des protéines Rab, principaux acteurs du transport

endosomal (116). De plus, le complexe ESCRT et les tétraspanines assurent le recrutement d'ARNs, majoritairement non codants, ainsi que de certaines protéines associées, notamment AGO2 (Argonaute 2) et YB-1 (Y-box binding protein 1) (178). En particulier, les ARNy, impliqués dans la dégradation des ARNs, constituent la catégorie d'ARNs non codants la plus représentée au sein des exosomes. Ils seraient 80 fois plus enrichis dans les exosomes sécrétés que dans le milieu intracellulaire. Leur relargage via les exosomes contribue au maintien de l'homéostasie des ARNs de la cellule sécrétrice. Les exosomes contiennent d'autres acides nucléiques comme des ADNs et ARNs codants, dont le relargage et la réception modulent l'expression génétique des cellules sécrétrices et réceptrices (168, 169, 179). Par ailleurs, les tétraspanines sont responsables de l'incorporation de la E-cadhérine, de la β -caténine et des glycoprotéines Wnt (137). L'implication des microdomaines enrichis en lipides dans la formation des VIL induit la présence des molécules associées à ces microdomaines comme la flotilline 1 et 2, la protéine PGRL (CD81 regulatory-like protein) et la stomatine (177).

Enfin, certaines protéines sont retrouvées dans les exosomes à des concentrations similaires ou inférieures à leur concentration intracellulaire, telles que la protéine chaperonne HSC70, les protéines du cytosquelette Actine, Vimentine, Taline et Annexine, ainsi que les enzymes PGK1 (phosphoglycerate kinase 1) et GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (137, 177, 180).

1.5.1.2. La composition des apo-exosomes

Tout comme les exosomes, les apo-exosomes présentent une forte hétérogénéité de composition, dépendant de leur mode de biogenèse, du type cellulaire de sécrétion et du contexte physiologie et pathologique.

Il existe un faible nombre d'études analysant le contenu spécifique des exosomes générés dans un contexte apoptotique (4 études à notre connaissance), au regard du nombre d'études analysant les exosomes. Néanmoins, il semble que les apo-exosomes se caractérisent par l'expression de certains marqueurs classiques des exosomes, en particulier CD63, très fortement enrichie, mais également CD9, TSG101 et Synténine-1 (22). De plus, les apo-exosomes expriment les protéines lysosomales LAMP1 et 2, ainsi que la protéine induite par le stress HSP70 (heat shock protein 70), qui semblent être retrouvées en quantité plus importante que dans les exosomes (144).

Les études menées sur la composition des apo-exosomes s'attachent à l'analyse d'apo-exosomes libérés par un type cellulaire précis et dont l'apoptose n'est pas déclenchée par le même inducteur. Les données obtenues ne fournissent donc pas une description globale de la composition des apo-exosomes en tant que catégorie, mais en tant que sous-population d'apo-exosomes produits par un type de cellule et par un inducteur de mort particulier. Notamment, le fragment LG3 du perlécan et la sous-unité catalytique 20s active du protéasome sont

spécifiquement retrouvés dans les apo-exosomes issus des cellules endothéliales apoptotiques, accélérant le rejet d'une allogreffe vasculaire, *in vitro* et *in vivo*. Ces molécules constituent des marqueurs particulièrement utiles pour leur identification et leur étude, mais restent spécifiques des apo-exosomes sécrétés par ces cellules et dans ces conditions d'induction de l'apoptose (144). A nouveau, ces études révèlent l'hétérogénéité qu'il existe au sein d'une catégorie de VE, y compris au sein des exosomes apoptotiques.

Par ailleurs, une étude démonte que les apo-exosomes se caractérisent par leur composition enrichie en ARNs non codants. Une analyse, par transcriptomique et à partir des bases de données pré-existantes, du contenu des apo-exosomes s'attache à décrire de manière approfondie les différents types de transcrits qu'ils contiennent. Parmi les ARNs non codants retrouvés, les ARNs répétés dispersés à caractéristiques virales en représentent la moitié. Acteurs de l'auto-immunité, ils font partie de la catégorie des LTRs (« long terminal repeats »), des LINEs (« long interspersed nuclear elements ») et des SINEs (« short interspersed nuclear elements »), tous grandement présents dans les apo-exosomes. De plus, un tiers des transcrits des apo-exosomes correspond à des petits ARNs nucléaires, comme l'ARNsn U1 impliqué dans différents processus fondamentaux tels que l'épissage des ARNs messagers et la maturation des ARNs ribosomiques. Les apo-exosomes contiennent également une grande quantité de séquences Alu, éléments mobiles les plus abondants du génome humain, qui participent à la synthèse ribosomique des protéines membranaires et sécrétées. Enfin, certains ARNs présentent une séquence nucléotidique particulièrement enrichie en motifs U et GU, ainsi que des structures tridimensionnelles instables (10, 181).

1.5.2. La composition des microvésicules

Les microvésicules sont générées à la membrane cellulaire, par conséquent, de nombreux composants de la membrane plasmique vont y être retrouvés. De ce fait, les microvésicules présentent notamment un fort enrichissement en cholestérol, sphingolipides et céramides (177). Dans une moindre mesure, d'autres protéines membranaires sont exprimées à la surface des microvésicules, telles que des tétraspanines, des métalloprotéines, des récepteurs aux glycoprotéines, ainsi que des protéines d'adhésion comme les intégrines (182). En plus des protéines membranaires, les microvésicules se caractérisent par un enrichissement en protéines du cytosquelette Actine et Tubuline, et par la présence de protéines cytosoliques comme HSP90 (heat shock protein 90) et l'enzyme GAPDH (11, 183). Les GTPases Rho et Ras, en tant qu'acteurs des remaniements du cytosquelette à l'origine de la biogenèse des microvésicules, sont également retrouvées dans ces dernières. Enfin, de manière similaire aux exosomes, des acides nucléiques sont présents dans les microvésicules (184).

I.5.3. La composition des corps apoptotiques

La biogenèse des corps apoptotiques est une caractéristique majeure du processus de mort cellulaire par apoptose (185). Ils contiennent donc une grande diversité de composants et de débris cellulaires, tels que des fragments de chromatine, des morceaux de noyau, des portions de cytosol, voire des organelles entières. Dans ce contexte, les protéines du Golgi GM130, l'histone H3 et la Tubuline sont des protéines caractéristiques des corps apoptotiques (144).

Au cours de la fragmentation cellulaire, les corps apoptotiques, rapidement phagocytés, facilitent l'élimination de la cellule apoptotique et des débris cellulaires associés (149). Les corps apoptotiques expriment donc à leur surface des signaux de reconnaissance pour les phagocytes, tels que la phosphatidylsérine (PtdSer) (10). Enfin, les corps apoptotiques étant générés à la membrane plasmique, ils se constituent d'une grande quantité de lipides membranaires (181).

Catégories	Exosomes	Apo-exosomes	Microvésicules	Corps apoptotiques
Tailles	30-200 nm		50-1000 nm	1-5 µm
Sites de biogenèse	Système endosomal		Membrane plasmique	Membrane plasmique
Marqueurs moléculaires	Acteurs de la biogenèse (TSG101, Synténine-1, CD63, S1P) Composants membranaires (CD9, Cholestérol, Céramides, Flotilline, Lipides)		Protéines du cytosquelette (Tubuline, Actine) Composants membranaires (Cholestérol, Sphingolipides, Céramides) Acteurs de la biogenèse (GTPases Rho/Rhas) Protéine chaperonne (HSP90) Protéines du cytoplasme (GAPDH) Molécules d'adhésion (Intégrines) ARNs	Composants et débris cellulaires (Fragments de chromatine, Morceaux de noyaux, Portions de cytosol, Organelles) Protéine du cytosquelette (Tubuline) Signaux de reconnaissance pour les phagocytes (PtdSer) Lipides membranaires ARNs
	Régulateurs du transport endosomal (GTPases ARF6/RABs) Molécules de transduction du signal (Protéine kinase, β-caténine, Glycoprotéines Wnt) Protéines du cytosquelette (Actine, Vimentine, Taline, Annexine) Protéine chaperonne (HSC70) ADNs et ARNs	Protéines lysosomales (LAMP1 et 2) Protéine chaperonne (HSP70) Molécules de transduction du signal mentionnées par une étude (LG3, sous-unité du protéasome) ARNs (non codants) Composition encore peu définie		

Figure 11 : Tableau récapitulatif des principaux marqueurs moléculaires associés à chaque catégorie de VE

I.6. Les fonctions physiologiques des VE

Initialement perçues comme des débris cellulaires, les VE sont désormais considérées comme des acteurs majeurs du maintien de l'homéostasie cellulaire et de la communication inter-cellulaire. Elles assurent la mise en place de réponses cellulaires adaptées et coordonnées à l'échelle de l'organisme, que ce soit au niveau des cellules sécrétrices ou des cellules réceptrices. Les fonctions des VE sont très diversifiées, dépendantes de leur contenu, lui-même grandement conditionné par la nature de la cellule sécrétrice et le contexte physiologique. Dans cette partie, nous allons aborder des exemples de fonctions physiologiques fondamentales des VE telles que l'élimination extracellulaire, ainsi que divers types de communication inter-cellulaire qu'elles médient dans la régulation du fonctionnement de différents tissus cellulaires.

I.6.1. L'élimination extracellulaire

L'incorporation de molécules intracellulaires dans les exosomes, au cours de leur formation, assure leur évacuation du milieu intracellulaire par le biais de la sécrétion exosomale. L'externalisation de ces molécules participe alors au maintien de l'homéostasie cellulaire et aux adaptations phénotypiques en réponse aux modulations des conditions physiologiques (186).

Ce processus peut être mis à profit pour le relargage de molécules toxiques dans le but de préserver l'homéostasie cellulaire. En effet, des protéines présentant des anomalies conformationnelles délétères peuvent être retrouvées enrichies au sein des exosomes, telles que le peptide β -amyloïde, la protéine Tau, l' α -synucléine, ainsi que des protéines prions. En favorisant l'évacuation des protéines toxiques du milieu intracellulaire, les VE apparaissent comme un mécanisme de contrôle qualité supplémentaire dont dispose la cellule, participant à la préservation de l'homéostasie cellulaire (186-189). Cependant, ces mécanismes, à long terme, sont susceptibles de provoquer le développement de pathologies, comme les maladies neurodégénératives, abordées dans la partie « I.7. VE en contexte pathologique ».

L'incorporation de molécules spécifiques au sein des VE peut également moduler le fonctionnement des cellules. Ce mécanisme contribue à la réponse phénotypique adaptée des cellules au contexte physiologique.

Plus particulièrement, des modulations de l'expression génétique durant l'activation ou la transformation des cellules musculaires semblent être médiées par l'évacuation du miR-182 au sein des exosomes. Le miR-182 serait responsable de la modulation négative de l'expression du facteur de transcription FoxO3 (Forkhead box O3). Son élimination du milieu intracellulaire via sa sécrétion exosomale, *in vitro* et *in vivo*, permettrait alors l'expression de FoxO3. L'expression de ce facteur de transcription stimulerait l'expression de composants des systèmes ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome, tels que MAFbx/atrogin-1, ATG12 (autophagy-related protein 12), cathepsine L et LC3 (microtubule-associated protein light chain 3). La modulation positive de l'autophagie contribue à l'acquisition d'un phénotype d'atrophie par les cellules musculaires en réponse à diverses conditions physiologiques. Les exosomes constituent donc un mécanisme de modulation rapide de l'expression génétique, par le relargage de microARNs, favorisant les adaptations du fonctionnement cellulaire (190).

La sécrétion des microARNs via les VE constitue également un mécanisme de régulation rapide de l'expression génétique au sein des lymphocytes. *In vitro*, les lymphocytes primaires murins et humains modulent négativement leur niveau d'expression en miR-150 via son incorporation au sein des exosomes et son évacuation lors de leur libération dans le milieu extracellulaire. Le niveau d'expression intracellulaire du miR-150 diminue de manière concomitante à l'accumulation des exosomes enrichis en miR-150 dans le milieu extracellulaire. *In vivo*, les exosomes enrichis

en miR-150 sont également retrouvés dans le sang humain et murin après vaccination. De plus, une concentration sérique faible en exosomes enrichis en miR-150 est associée à un mauvais pronostic chez des patients atteints de septicémie sévère. Au niveau moléculaire, la modulation négative de l'expression du miR-150 est associée à une augmentation de l'expression du récepteur de chimiokines CXCR4 et du facteur de transcription c-Myb, qui à son tour favorise l'expression de la protéine pro-survie Bcl-2. L'expression de ces protéines promeut l'activation et la différenciation des lymphocytes, ainsi que leur survie, respectivement. Les exosomes, via cette fonction d'évacuation des microARNs, contribuent donc à l'efficacité et l'optimisation de la réponse immunitaire adaptative (179).

Enfin, une analyse transcriptomique des exosomes libérés par la lignée cellulaire HMEC-1 (human endothelial cell line 1) démontre un enrichissement particulièrement élevé de leur contenu en ARNy non codants. Les ARNy constituent la catégorie d'ARNs la plus représentée au sein des exosomes. Les ARNy sont impliqués dans la dégradation des ARNs, qu'ils soient normalement conformés ou qu'ils présentent des anomalies structurales. Des produits de dégradation des ARNs sont également retrouvés en grande quantité au sein des exosomes, assurant leur évacuation (191).

L'ensemble de ces données suggèrent que les VE favorisent le maintien de l'homéostasie des ARNs intracellulaires en évacuant les ARNs dégradés, et la régulation de l'expression génétique en relarguant certains ARNs fonctionnels spécifiques.

I.6.2. Des médiateurs de la communication inter-cellulaire

Les VE sont désormais unanimement considérées comme des acteurs majeurs de la communication inter-cellulaire. Dans le contexte de la communication inter-cellulaire, une grande diversité de fonctions sont attribuées aux VE. Par conséquent, nous nous attacherons à présenter des exemples caractéristiques du rôle des VE dans le fonctionnement de différents tissus. De manière générale, les VE peuvent médier deux types de communication inter-cellulaire, à savoir une communication locale ou une communication à distance (13, 129, 149, 150, 177, 186).

Dans le cadre de la communication locale, les VE agissent sur les cellules voisines de la cellule sécrétrice dont elles sont originaires, par exemple sur les cellules localisées au sein du même organe que la cellule sécrétrice. Elles induisent alors des modulations du fonctionnement cellulaire et assurent l'adaptation phénotypique de la cellule à son environnement local. La communication inter-neurone médiée par les VE en est un exemple (192). Dans le cadre de la communication à distance, les VE agissent à une échelle globale. Leur faculté de dispersion à travers l'organisme leur confère une capacité d'optimisation des échanges. De ce fait, elles assurent la coordination des réponses cellulaires et contribuent, en particulier, au maintien de l'intégrité de l'organisme en accélérant et en amplifiant les échanges immunitaires (8).

De plus, la communication inter-cellulaire médiée par les VE peut affecter le fonctionnement cellulaire de multiples façons. En effet, les fonctions attribuées aux VE sont très diversifiées et peuvent avoir des effets contradictoires. Leur fonction est conditionnée par leur composition, elle-même dépendante du type cellulaire de sécrétion, ainsi que par la cellule ciblée et par le contexte physiologique.

1.6.2.1. Le fonctionnement du système nerveux central

Les neurones communiquent via la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ce mode de communication, au niveau de la synapse, nécessite une connexion entre axone et dendrites de neurones voisins. De manière moins évidente, la transmission de l'information neuronale peut également être assurée par les VE de petites tailles incluant des exosomes. Les VE apparaissent donc comme un mécanisme de communication inter-neurone indépendant de la connexion synaptique. Elles favorisent alors la communication entre neurones non connectés et sont capables d'affecter leur fonctionnement cellulaire, en particulier la synaptogenèse, la croissance et le guidage axonal, la transmission synaptique et la potentialisation à long terme. La diversité de fonctions des VE est attribuée à la variabilité de leur composition. Il en va de même au sein du système nerveux. Chez la drosophile, les exosomes enrichis en protéine Wnt et son transporteur Evi/Wntless induisent la synaptogenèse et le développement de la jonction neuromusculaire et favorisent la potentialisation à long terme au niveau de l'hippocampe. Chez les mammifères, le récepteur AMPA, médiateur du potentiel post-synaptique excitateur au sein des neurones, est également un composant important des exosomes du système nerveux central. Ces exosomes participent donc au contrôle de l'excitabilité neuronale et à la plasticité synaptique (192).

Les exosomes favorisent la transmission neuronale à une échelle plus large que la communication synaptique. Cependant, cette communication et les adaptations phénotypiques qui en découlent concernent spécifiquement les cellules réceptrices voisines des cellules sécrétrices des VE. La nature restreinte de cette communication apparaît essentielle pour assurer le bon fonctionnement du système nerveux.

1.6.2.2. Le fonctionnement du système immunitaire

Dans les échanges immunitaires, la communication inter-cellulaire médiée par les VE s'avère généralisée à l'échelle de l'organisme et connecte de multiples acteurs du système immunitaire. La fonction des VE dans les échanges immunitaires est l'une des premières à avoir été démontrées dans les années 1980-90 (8). La sécrétion d'exosomes par les cellules dendritiques est alors mise en évidence. Ces VE héritent de molécules des CMH de classe I et/ou II. Exprimées en surface des VE, ces molécules leur confèrent la capacité d'activer les lymphocytes T *in vitro*. Les VE héritent également de leur cellule d'origine de molécules d'adhésion et de co-

stimulation, par le biais desquelles elles peuvent entrer en contact avec de multiples cibles immunitaires et moduler leur activité. Les VE sont donc impliquées dans le processus de présentation d'antigènes et contribuent à l'activation de la réponse immunitaire (8).

Désormais, les mécanismes médiés par les VE dans **le processus de présentation d'antigènes** sont bien décrits (193-195). Les VE expriment à leur surface des complexes CMH/antigènes, peuvent présenter directement ces molécules aux lymphocytes T (« direct antigen presentation ») et sont capables d'induire leur activation. Une forme particulièrement efficace de présentation d'antigènes est semi-directe (« semi-direct antigen presentation »). Dans ce contexte, approximativement 100 fois moins d'exosomes en interaction avec les cellules dendritiques suffisent pour conduire au même niveau d'activation des lymphocytes T que les exosomes libres. Le mécanisme présumé est que les cellules dendritiques assurent le recrutement d'exosomes porteurs de complexes CMH/antigènes en s'associant avec eux, favorisant ainsi leur concentration au niveau de la synapse immunologique entre cellules dendritiques et lymphocytes T. Les VE contribuent alors grandement à l'établissement de la synapse immunologique et à son efficacité dans l'activation des lymphocytes. D'autre part, l'endocytose des VE au sein des cellules dendritiques permet le transfert de complexes CMH/antigènes des VE aux cellules dendritiques réceptrices, et par conséquent, la présentation indirecte de ces complexes CMH/antigènes aux lymphocytes T (« indirect antigen presentation »). Ce processus favorise la mobilisation des cellules immunitaires dans la lutte contre les agents pathogènes et les cellules compromises (193, 196, 197).

Les VE expriment également une multitude de molécules de co-stimulation, modulant positivement la maturation et l'activation des lymphocytes T par le renforcement de la stabilisation et de l'efficacité de la synapse immunologique, telles que SGPL1 (sphingosine-1-phosphatase lyase 1), GDIR1 (Rho GDP-dissociation inhibitor 1), DOCK2 (dedicator of cytokinesis protein 2) et PAK2 (p21 protein-activated kinase 2), ainsi que CD40, CD40L et OX40L (198, 199).

Les lymphocytes T activés sécrètent également des VE, quant à eux, enrichies en récepteurs aux lymphocytes T (TCR), susceptibles d'être transmis à d'autres lymphocytes T par fusion des VE avec leur membrane (200, 201). Au même titre que pour les lymphocytes T, les VE contribuent au transfert entre lymphocytes B de récepteurs aux lymphocytes B (BCR). Ces mécanismes de transfert des récepteurs entre lymphocytes, médiés par les VE, leur permettent de diffuser ces récepteurs, de répondre à de nouveaux antigènes en recevant de nouveaux TCR et BCR et optimisent encore l'efficacité de la réponse immunitaire par la mobilisation d'un plus grand nombre de lymphocytes (202).

Outre ce rôle fondamental dans l'activation de la réponse immunitaire, les VE sont également impliquées dans la suppression immune, l'immunité anti-tumorale, la mémoire immunitaire, et la tolérance du non-soi. Toutes ces fonctions immunomodulatrices peuvent être assurées par les

VE grâce aux molécules qu'elles expriment, en particulier des cytokines et des microARNs pro-inflammatoires. Leur contenu spécifique s'avère déterminant pour leur conférer une spécificité d'action et de cibles immunitaires (193, 203).

De nombreuses molécules sont désormais connues pour leur participation dans les processus de régulation de l'immunité via leur expression au niveau des VE. Dans le cadre de **la suppression immune**, correspondant à l'extinction de la réponse immunitaire (RICD pour « restimulation-induced cell death »), les molécules immuno-régulatrices à la surface des VE, telles que PD-L1 (immune-checkpoint molecules programmed death ligand 1), CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) et le ligand inducteur de l'apoptose FasL, interagissent avec leur ligand et récepteur respectifs exprimés à la surface des lymphocytes T et des cellules NK (« natural killer »). Ces interactions participent à l'inhibition de l'activité des lymphocytes et/ou provoquent leur élimination par le déclenchement de l'apoptose (204-206). Les VE contribuent donc aux processus de régulation du système immunitaire, indispensables à l'extinction appropriée de la réponse immunitaire, afin de prévenir le développement de réponses auto-immunes ou inflammatoires.

Par ailleurs, les VE dérivées des lymphocytes T régulateurs contiennent des microARNs inhibiteurs de la réponse immunitaire. Ces VE sont capables d'inhiber les lymphocytes T cytotoxiques activés en leur transmettant des ARNs, tels que miR-155, Let7b et Let7d. La présence du miR-155 et du miR-142-3p dans les VE contribue également à l'inhibition de la production de cytokines par les cellules dendritiques, et donc à la diminution de l'efficacité du recrutement des cellules immunitaires et de la réponse immunitaire (207, 208).

Enfin, les VE peuvent transporter des cytokines ou des ligands qui activent leur récepteur présent à la surface des lymphocytes T régulateurs et des cellules myéloïdes suppressives (« myeloid derived suppressor cells »), comme la cytokine immunosuppressive TGF β , associée au β -glycan de la surface des VE. Cette cytokine induit la diminution de l'expression du récepteur activateur NKG2D à la surface des cellules NK, à l'origine de leur inhibition (209).

L'ensemble de ces processus contribue à l'atténuation et/ou l'arrêt de la réponse immunitaire, et donc dans un contexte physiologique, permet de prévenir le développement de l'auto-immunité et de l'inflammation.

Concernant le rôle des VE dans **l'immunité anti-tumorale**, il est démontré que les VE produites par les cellules dendritiques et les cellules cancéreuses elles-mêmes contribuent à la diffusion des antigènes tumoraux et sont capables d'activer les lymphocytes T, par conséquent de stimuler la réponse du système immunitaire pour lutter contre la tumeur et de favoriser la régression tumorale dans de nombreux modèles murins de tumeurs. Les processus présentés plus haut, de la mise à profit des propriétés des VE dans la présentation d'antigènes, sont également impliqués dans l'immunité anti-tumorale (8, 193). De plus, la présentation croisée (« cross-presentation ») des complexes CMH/antigènes tumoraux aux lymphocytes T se produit par migration des cellules dendritiques depuis le microenvironnement tumoral vers les organes lymphoïdes pour

transmettre aux cellules dendritiques conventionnelles ces antigènes, afin de les mobiliser dans le processus d'immunité anti-tumorale. Dans ce contexte, les VE libérées par les cellules dendritiques migratrices peuvent accentuer localement le transfert des complexes CMH/antigènes tumoraux aux cellules dendritiques conventionnelles. Les VE semblent également participer à la diffusion des antigènes tumoraux à destination des cellules dendritiques conventionnelles sans nécessiter de contact direct entre les cellules dendritiques conventionnelles et celles du microenvironnement tumoral (210, 211). Les VE contribuent donc grandement à l'optimisation de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Les complexes CMH/antigènes véhiculés et transférés par les VE issues des cellules dendritiques, de lymphocytes B et de cellules tumorales favorisent l'activation et la maturation des lymphocytes T, mais aussi la préservation des lymphocytes T mémoire, et par conséquent, semblent promouvoir **la mémoire immunologique** (193).

Le rôle des VE dans **la tolérance du non-soi** est également fondamental. À la suite d'une greffe, les VE portant les complexes CMH/antigènes du donneur entrent en contact et se fixent aux cellules dendritiques du receveur. Les lymphocytes T régulateurs sont alors activés et inhibent le rejet du greffon. En modèle murin, des grappes de VE contenant des complexes CMH/antigènes de l'allogreffe sont observées par microscopie électronique, fixées aux cellules dendritiques de la souris receveuse, renforçant l'activation des lymphocytes T régulateurs et favorisant la préservation du tissu greffé (212). La gestation est un autre exemple du rôle des VE dans la tolérance du non-soi. Au cours de cette période, les VE sont particulièrement enrichies dans le sang. Ces VE d'origine placentaire expriment notamment le facteur de blocage induit par la progestérone (PIBF), modulant l'activité des lymphocytes T et stimulant la production de cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10. Les VE permettent ainsi d'inhiber l'activation des lymphocytes T cytotoxiques maternels dirigés contre les cellules fœtales (213).

Enfin, les VE apoptotiques participent à la mobilisation des cellules immunitaires pour **l'élimination des cellules apoptotiques**. La phagocytose correspond aux processus d'internalisation et d'élimination, notamment des cellules apoptotiques, par les cellules immunitaires spécialisées, les phagocytes, incluant les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Le recrutement des phagocytes au niveau du site de la mort cellulaire est permis par la sécrétion de signaux d'attraction (« find-me signals ») par les cellules apoptotiques, tels que l'ATP, l'UTP, la chimiokine CX3CL1 et la lysophosphatidylcholine. Les apo-exosomes et les corps apoptotiques participent à la dispersion de ces signaux, en particulier de la chimiokine CX3CL1, et expriment d'autres molécules aux propriétés chemoattractantes comme ICAM-3 (intercellular adhesion molecule-3) (10). À la suite de leur attraction sur le site de l'apoptose, les phagocytes reconnaissent les cellules apoptotiques grâce aux signaux de reconnaissance (« eat-me signals ») qu'elles exposent à leur surface, tels que la PtdSer. L'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose est alors facilitée par les VE

apoptotiques qu'elles sécrètent. En effet, la fragmentation de la cellule mourante via la sécrétion de VE apoptotiques assure son démantèlement. Ces VE expriment également les signaux de reconnaissance à leur surface et sont phagocytées. Les apo-exosomes, comme les corps apoptotiques, sont préférentiellement éliminés par les phagocytes car plus facilement phagocytés du fait de leur petite taille, au regard de la taille de la cellule (10).

Grâce à leur grande capacité de dispersion via les fluides de l'organisme et en fonction des molécules qu'elles expriment, les VE contribuent donc à l'optimisation des échanges immunitaires. Ainsi, elles jouent un rôle déterminant dans l'immuno-modulation et l'efficacité de la réponse immunitaire.

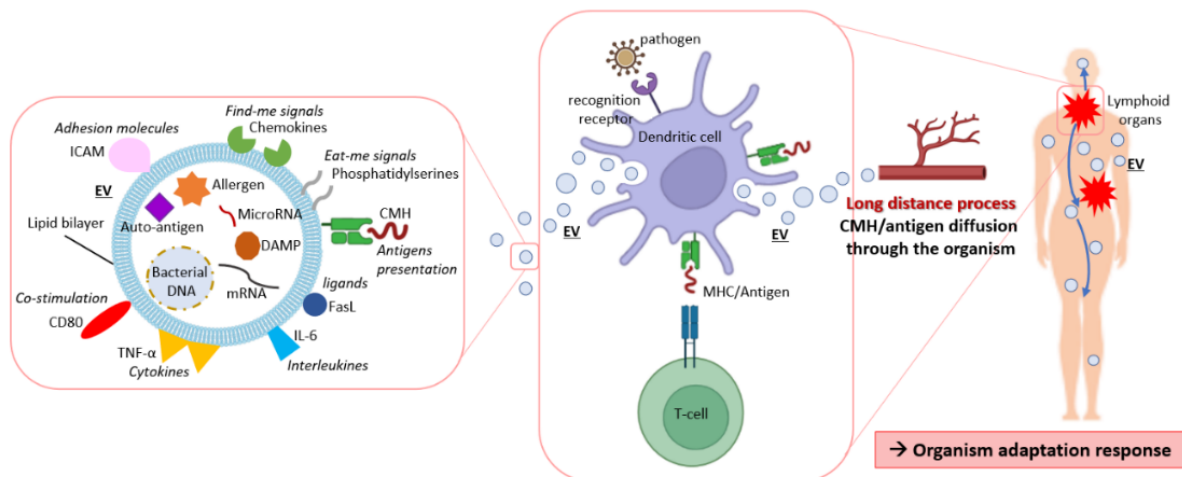


Figure 12 : Les échanges immunitaires médiés par les VE : communication globale à l'échelle de l'organisme

I.6.2.3. Le fonctionnement du tissu épithélial

Outre son aspect local ou global, la communication inter-cellulaire médiée par les VE se caractérise par une grande diversité de fonctions, fortement conditionnées par l'origine des VE, dont dépend leur composition. Ces fonctions sont également étroitement liées aux conditions cellulaires de sécrétion, notamment viable ou apoptotique.

Les conditions de sécrétion des VE déterminent grandement leurs fonctions, en particulier lorsqu'elles sont générées en contexte apoptotique. Les corps apoptotiques et les apo-exosomes, sécrétés par les cellules épithéliales mourant par apoptose, favorisent la prolifération des cellules souches épithéliales environnantes. Ce mécanisme assure la stabilité du nombre de cellules épithéliales viables et donc le maintien de l'intégrité du tissu épithélial. Il a été montré dans le contexte du tissu épithélial que les VE libérées en condition apoptotique et donc dépendantes de l'activation des caspases sont enrichies en protéine Wnt8a. A la suite de leur sécrétion, elles entrent en contact avec les cellules souches au niveau desquelles elles activent la signalisation Wnt. Si le mécanisme précis d'activation de la voie de signalisation reste à

préciser, il est démontré que cette signalisation stimule la division cellulaire, et par conséquent la prolifération cellulaire. Cette fonction correspond à la prolifération induite par l'apoptose ou AIP, par conséquent spécifique des VE apoptotiques (« apoptosis-induced proliferation »), et sera également présentée dans le cadre du développement tumoral. Toutefois, cet exemple permet de souligner l'importance des conditions cellulaires de sécrétion des VE dans la détermination de leur fonction, qui dans ce contexte, peuvent être impliquées dans la prolifération compensatoire des cellules épithéliales afin de préserver l'homéostasie du tissu épithélial (214).

1.6.2.4. Le fonctionnement des cellules souches

La communication via les VE peut avoir des effets contradictoires selon la nature des cellules impliquées, illustrés par les exemples qui suivent sur le maintien à l'état de cellule souche ou l'induction de la différenciation cellulaire.

Les cellules souches embryonnaires libèrent des VE capables d'induire leur maintien à l'état de cellule souche. *In vitro*, la différenciation de cellules souches embryonnaires peut être induite par le biais de conditions de culture particulières. Dans ces mêmes conditions, inductrices de la différenciation, les cellules souches embryonnaires traitées avec des VE de cellules souches maintiennent leurs propriétés de cellule souche. En effet, leur expression génétique, spécifique de l'état de cellule souche, est préservée, notamment l'expression des facteurs de transcription Oct3/4 et Nanog. Ces cellules conservent également leur capacité de pluripotence et de génération de souris chimériques. Au niveau moléculaire, les VE libérées par les cellules souches sont enrichies en fibronectine à leur surface. La fibronectine des VE active certaines intégrines de la membrane des cellules souches réceptrices conduisant à l'activation de FAK (« focal adhesion kinase ») au sein du complexe d'adhérence. L'activation de FAK dans les cellules souches sous conditions inductrices de la différenciation est alors nécessaire à leur maintien en l'état de cellule souche embryonnaire (215).

Si les VE sont capables de favoriser le maintien à l'état de cellules souches, elles peuvent, à l'inverse, induire la différenciation cellulaire dans d'autres conditions. En effet, une étude révèle que les exosomes libérés par les cellules souches de la pulpe dentaire induisent la différenciation odontogène de cellules souches humaines issues de la pulpe dentaire, mais aussi de la moelle osseuse. Ces exosomes sont capables de se fixer aux protéines de la matrice extracellulaire des cellules réceptrices, comme le collagène de type I et la fibronectine. Cette interaction permet leur endocytose dépendante des cavéolines. À la suite de leur internalisation, la voie de signalisation associée à la MAPK p38 (« p38 mitogen activated protein kinase ») est activée. La cascade de phosphorylation qui en découle conduit à l'activation de l'expression des gènes spécifiques de la différenciation odontogène, tels que les facteurs de croissance BMP9 (bone morphogenetic protein 9) et GDF10 (growth differentiation factor 10), le facteur de transcription RUNX2 (runt-related transcription factor 2) et les protéines ALPL (alkaline phosphatase protein), COL1

(collagen type 1) et DSPP (dentin sialophosphoprotein). Cette différenciation odontogène est aussi bien induite sur des cellules souches de la pulpe dentaire, que sur des cellules souches de la moelle osseuse. *In vivo*, ces exosomes permettent la régénération du tissu dentaire endommagé (216).

Les VE libérées par les cellules souches sont donc capables d'induire la différenciation spécifique des cellules souches ou à l'inverse de maintenir leur état indifférencié. Cette donnée renforce à nouveau la nécessité de considérer la source des VE dans le cadre de leur étude, cette source leur conférant des spécificités propres, en particulier une spécificité de composition, et par conséquent de fonction.

I.7. Les VE en contexte pathologique

I.7.1. L'inflammation et la dérégulation de l'immunité

Nous avons vu précédemment que les VE sont impliquées dans le processus de présentation d'antigènes, optimisant ainsi l'efficacité de la réponse immunitaire indispensable au maintien de l'intégrité de l'organisme. Cependant, les exosomes, et plus spécifiquement les apo-exosomes, disposent d'un très fort potentiel immunogène. Les apo-exosomes peuvent donc être responsables de réponses immunitaires mal adaptatives potentiellement à l'origine de maladies inflammatoires et auto-immunes. Les fonctions des apo-exosomes sont peu connues et seuls quelques groupes de recherche ont publié sur le sujet. Par conséquent, les données présentées s'appuient sur un très faible nombre d'études, mais qui convergent toutes vers la même conclusion, à savoir que les apo-exosomes sont des acteurs majeurs de l'inflammation et de la dérégulation de l'immunité.

L'étude de S.J. Park et al. mentionnée précédemment propose un mécanisme d'activation de la réponse inflammatoire par les apo-exosomes dépendant de l'expression exosomale du couple ligand-récepteur S1P/S1PR. Ce mécanisme d'activation des macrophages par S1P/S1PR a été démontré *in vitro* en utilisant la lignée monocyttaire humaine THP-1 et sur des macrophages issus de la moelle osseuse de souris (22).

Les apo-exosomes produits par les cellules HeLa après une stimulation pro-apoptotique par la staurosporine, expriment le complexe S1P/S1PR et sont capables de fusionner avec la membrane plasmique des macrophages. Par le biais de cette fusion, les apo-exosomes transfèrent aux macrophages le complexe S1P/S1PR, exposant le domaine cytosolique des récepteurs S1PR aux acteurs intracellulaires de transduction du signal au sein des macrophages. Cette configuration favorise le déclenchement de la signalisation S1P/S1PR. Le complexe S1P/S1PR, associé à la protéine Gα12/13, induit le recrutement du complexe RhoA/NOD2/RIP2/IKK. Le signal est ensuite transduit au complexe NF-κB, incluant IκBβ, p65, and c-Rel. Le complexe NF-κB est alors transloqué dans le noyau du macrophage, stimulant la transcription de l'interleukine pro-inflammatoire IL-1β, de la MAP Kinase p38, ainsi que d'autres

cytokines et chémokines inflammatoires (22).

Par leur capacité à stimuler la production de molécules pro-inflammatoires, ces apo-exosomes apparaissent comme des motifs moléculaires associés aux dégâts ou DAMP (« damage-associated molecular pattern ») jouant un rôle potentiel dans la dérégulation du système immunitaire comme les maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes (22).

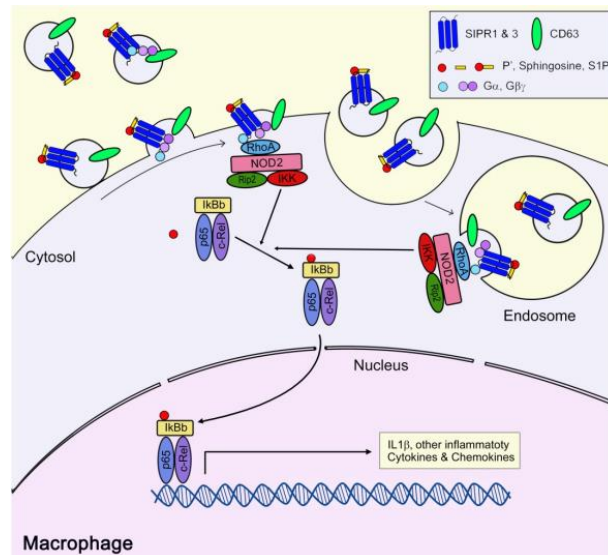


Figure 13 : Représentation du mécanisme de production d'IL-1 β par les macrophages, induite par la fusion des apo-exosomes (22)

Une autre étude démontre le potentiel immunogène d'apo-exosomes produits par les cellules endothéliales apoptotiques à la suite de l'induction de l'apoptose provoquée par une déprivation en sérum dans le milieu de culture (« starvation »). Cette immunogénicité est alors décrite comme spécifique des apo-exosomes. Les exosomes sécrétés par les cellules viables et les corps apoptotiques ne présenteraient pas une telle activité. La sous-unité 20s active du protéasome, qui est le marqueur qui caractérise ces apo-exosomes, s'avère le régulateur de leur propriété immunogène. Les souris traitées avec ces apo-exosomes présentent un niveau d'activation élevé des lymphocytes B, alors à l'origine de la production d'auto-anticorps, en particulier d'anticorps anti-perlécan, une molécule de la membrane basale sur laquelle repose les cellules endothéliales. Cette production d'auto-anticorps est responsable d'une réponse auto-immune, provoquée par la présence d'un fragment particulier du perlécan qui est enrichi dans ces apo-exosomes (144).

À la suite d'une transplantation en modèle murin, ces apo-exosomes favorisent la production d'anticorps anti-perlécan, à l'origine cette fois de l'inflammation de l'allogreffe vasculaire, provoquant l'accélération du processus de rejet du greffon. Les apo-exosomes sont donc impliqués dans la réponse auto-immune et le rejet de la greffe. Cette étude présente, à nouveau, les apo-exosomes comme vecteurs paracrines de réponses immunitaires mal adaptatives (144).

Enfin, une dernière étude démontre que le potentiel immuno-stimulateur des apo-exosomes pourrait être associé à leur composition particulièrement enrichie en ARNs non codants. Ces ARNs leur sont spécifiques et ne sont pas retrouvés au sein des VE sécrétées par les cellules viables (181). Ils confèreraient aux apo-exosomes la capacité d'activer un large panel de récepteurs de l'immunité innée et adaptative. Ils activeraient ainsi des récepteurs de type RIG-I (RLR : RIG-I-like receptors), favorisant la reconnaissance des ARNs viraux issus d'une infection par un virus. Les récepteurs Toll-like (TLR), impliqués dans la réponse immunitaire adaptative dans le cadre d'infections microbiennes, en particulier TLR3, TLR7 et TLR8, sont également des cibles dérégulées par les ARNs des apo-exosomes. La composition spécifique des apo-exosomes en ARNs semble donc leur conférer un fort pouvoir en tant que médiateurs de l'auto-immunité (181).

Outre les cellules apoptotiques, les cellules viables sécrètent des VE pro-inflammatoires qui contiennent une certaine diversité de molécules leur conférant des propriétés de DAMP (217, 218). Ces propriétés restent limitées au regard de celles des apo-exosomes. Les molécules qui leur confèrent ces propriétés, présentes à l'intérieur ou en surface des exosomes et des microvésicules, incluent notamment la protéine nucléaire pro-inflammatoire HMGB1 (high mobility group box 1), des histones, des protéines induites par le stress de type HSP (heat shock protein), l'ATP qui active le récepteur P2Y11 des macrophages induisant la production de cytokines, des ANRs, en particulier des microARNs, ainsi que des ADNs, notamment des ADNs nucléaires et mitochondriaux (217-224).

1.7.2. Le détournement au profit de l'infection virale

Si les VE libérées par les cellules infectées peuvent être impliquées dans le processus de présentation d'antigènes limitant l'infection virale, elles peuvent aussi être détournées au profit de la propagation de certains virus.

Les microvésicules présentent de nombreuses caractéristiques communes avec l'enveloppe virale, telles que des propriétés biophysiques, le mode de biogenèse et l'internalisation par les cellules. Par conséquent, les microvésicules constituent des vecteurs efficaces pour la propagation virale (225).

Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1) est sécrété via un processus de bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule infectée. Ce bourgeonnement est à l'origine de la formation de microvésicules à l'intérieur desquelles le virus circule, favorisant sa transmission aux cellules voisines. Le HIV-1 recrute des composants de la machinerie ESCRT pour assurer les mécanismes de bourgeonnement et de fission membranaires (226). De nombreux virus requièrent le complexe ESCRT pour leur libération et leur transport via les microvésicules, notamment les rhabdovirus, les filovirus, les arenavirus, les paramyxovirus, ainsi que les virus de l'hépatite B et C (225, 227-229). Par ailleurs, certains virus, incluant le HIV-1 et le

HTLV-1 (human T cell lymphotropic virus type 1), utilisent les microdomaines membranaires riches en tétraspanines, en particulier CD63 et CD81, pour médier le bourgeonnement membranaire et la formation de microvésicules de transport (230-233).

Les virus ont donc la capacité d'utiliser les mécanismes moléculaires de biogenèse des microvésicules et d'employer ces microvésicules au profit de leur diffusion et de la propagation de l'infection virale.

Le processus de biogenèse des exosomes au sein du système endosomal intracellulaire est également détourné par les virus. La protéine virale Nef du HIV altère le fonctionnement du système endosomal, provoquant une augmentation du nombre d'endosomes, de lysosomes et de MVB (234-236). Ces perturbations induisent une sécrétion massive d'exosomes par les cellules infectées, au profit de la diffusion du virus (237). Les exosomes, comme les microvésicules, représentent donc des outils de sécrétion et de transport inter-cellulaire des virus.

Les VE apoptotiques sécrétées par les cellules apoptotiques infectées sont également employées au profit de l'infection virale. En effet, les corps apoptotiques sont capables d'assurer le transfert du virus du Chikungunya depuis des cellules infectées vers des cellules saines (238). De plus, les apo-exosomes participent à la modulation de la réponse immunitaire. L'infection par le HIV-1 se caractérise par un affaiblissement du système immunitaire du patient. Une inhibition de l'activation des cellules dendritiques de donneurs sains traités avec du sang de patients atteints du HIV-1 est constatée. Cette inhibition est médiée par les apo-exosomes libérés par les cellules mourantes durant l'infection, retrouvés en très grande quantité dans le sang des patients. Ces apo-exosomes semblent capables de se fixer au niveau du récepteur CD44 des cellules dendritiques et d'inhiber la production de cytokines responsables de l'activation des lymphocytes T et NK, conduisant à une inhibition des défenses immunitaires contre le virus lui-même et autres agents pathogènes (239).

I.7.3. Les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont des affections chroniques du système nerveux central. Elles sont associées au développement d'agrégats protéiques toxiques. Ces protéines présentent une forte propension à s'agréger et à échapper aux mécanismes de dégradation cellulaire. Des études récentes démontrent le rôle des VE dans la progression et l'aggravation de ces protéinopathies.

La maladie de Parkinson se caractérise par la formation d'agrégats protéiques, les corps de Lewy, composés de la protéine α -synucléine, et par la perte progressive des neurones dopaminergiques du mésencéphale. L' α -synucléine, initialement considérée comme une protéine exclusivement intracellulaire, a été détectée dans le sang et le fluide cérébrospinal de patients. *In vitro*, les neuroblastes de la lignée cellulaire SH-SY5Y modifiés génétiquement pour exprimer de

manière inductible l' α -synucléine, secrètent également cette protéine. L' α -synucléine est alors retrouvée dans le milieu extracellulaire à l'état soluble sous forme de monomère et d'oligomère, mais également contenue dans des exosomes. Ces exosomes sont générés au sein du système endosomal et libérés dans le milieu extracellulaire à la suite d'un influx calcique. Ils pourraient être responsables du transfert de l' α -synucléine à d'autres neurones environnants et affecter leur fonctionnement. En effet, le traitement par l' α -synucléine exosomale des neuroblastes sauvages SH-SY5Y et des cellules gliales BV2 contribue à leur mort par apoptose, médiée par l'activation de la caspase-3 (187). Une autre étude démontre que l'inhibition de la synthèse des exosomes au sein des cellules microgliales par traitement avec l'inhibiteur GW4869 de la sphingomyélinase neutre diminue la transmission de l' α -synucléine, limitant la propagation de la maladie (240). La sécrétion d' α -synucléine par le biais des exosomes participe donc, en plus de sa sécrétion sous forme soluble, à sa toxicité. De plus, les exosomes, grâce à leur grande capacité de dispersion, pourraient favoriser la dissémination de la protéine et la propagation de la pathologie au sein du système nerveux.

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau (tubulin-associated unit), qui fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules, présente des formes anormalement phosphorylées ayant une forte propension à s'agréger. Ces lésions cytoplasmiques altèrent le fonctionnement cellulaire des neurones, aboutissant à leur mort. L'agrégation intracellulaire de la protéine Tau est un mécanisme qui participe donc à la dégénérescence neuronale. Cette neurodégénérescence est à l'origine de la perte de la mémoire et des fonctions exécutives, caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Outre sa localisation intracellulaire, la protéine Tau a également été détectée dans le liquide cébrospinal des patients, suggérant sa sécrétion et son potentiel transfert inter-neurone. Tandis que la protéine Tau soluble correspond à une forme tronquée non toxique, la forme Tau exosomale possède le domaine terminal permettant son agrégation toxique. Les exosomes peuvent donc favoriser la transmission de la protéine Tau aux neurones environnants, spécifiquement sous sa forme toxique, et ainsi la propagation de la pathologie (188). De plus, l'inhibition de la synthèse de ces exosomes par traitement avec l'inhibiteur GW4869 *in vitro* et *in vivo* diminue la propagation de la protéine Tau, et par conséquent sa pathogénicité (241).

Au même titre que la protéine Tau, le peptide β -amyloïde est détecté dans les exosomes et peut être transféré par leur intermédiaire aux neurones environnants, ainsi que via le système endosomal entre neurones interconnectés. Ce peptide, constitutif des plaques amyloïdes extracellulaires neurotoxiques, se retrouve combiné à des marqueurs spécifiques des exosomes au sein de ces plaques, suggérant un apport de peptides β -amyloïdes par les exosomes pour leur développement (188).

Les maladies à prions sont des maladies transmissibles et fatales, touchant le système nerveux central. Les trois principales maladies à prion chez l'homme sont les maladies de Creutzfeldt-

Jakob, l'insomnie fatale familiale et le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker. Elles sont dues à une anomalie conformationnelle de la protéine prion PrPC, alors sous sa forme pathogène PrPSc, qui présente une forte propension à s'agréger. Les agrégats formés provoquent la mort cellulaire des neurones, à l'origine de la neurodégénérescence. Aucun traitement n'existe à ce jour. La protéine prion PrPC, contenue au sein de microvésicules, a été détectée dans le plasma de patients. De plus, la totalité du complexe de signalisation, incluant la tyrosine kinase p59Fyn et les gangliosides GM1 et GM3, est également retrouvée au sein de ces microvésicules. Ces données suggèrent une potentielle diffusion de la protéine prion via les microvésicules, contribuant à la propagation de la maladie au sein du système nerveux central. *In vitro*, une étude révèle la présence, non seulement de la protéine prion PrPC, mais également de la protéine pathogène PrPSc, au sein des microvésicules libérées par deux lignées cellulaires neuronales Neuro-2a and Neuro-2a PK1 infectées. Les protéines prions PrPC et PrPSc font parties des protéines d'ancrage à la membrane plasmique (« glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins »), participant à la composition des rafts lipidiques. Cette localisation assure donc leur enrichissement au niveau des domaines préférentiels de biogenèse des VE, et de ce fait leur incorporation au sein de ces microvésicules. PrPC et PrPSc sont donc fortement enrichies au sein des microvésicules, au regard de leur présence dans les cellules infectées. *In vitro*, les microvésicules exprimant PrPSc sont capables d'initier l'infection de neuroblastes. Les microvésicules participent donc effectivement à la diffusion de la protéine pathogène de neurone en neurone, favorisant la progression de la pathologie. Enfin, le traitement de souris saines avec ces microvésicules est responsable de leur infection, suggérant qu'elles sont également impliquées de la transmission entre organismes de l'infection (189).

I.7.4. Les maladies cardiovasculaires

L'infarctus du myocarde est une cardiopathie ischémique provoquée par l'occlusion, partielle ou totale, de l'une des artères coronaires irrigant le cœur. Un fragment de plaque graisseuse se détache de la paroi interne d'un vaisseau sanguin et s'immobilise au sein de l'artère. Un caillot de sang se forme autour de la plaque et obstrue l'artère. Le sang ne peut plus circuler. Les cardiomyocytes, alors privés d'oxygène et de nutriments, meurent en moins de 20 minutes, provoquant la destruction d'une partie du muscle cardiaque (242).

In vitro, des cardiomyocytes murins isolés sont soumis à une brève hypoxie afin de mimer l'ischémie par infarctus du myocarde. Sous l'effet d'un stress modéré, comme l'hypoxie transitoire, les cardiomyocytes libèrent des VE en quantité trois fois plus importante qu'en condition basale. Ces VE comprennent, en particulier, des exosomes enrichis en HSP60 (heat shock protein 60). Cette protéine, exprimée à la surface des exosomes, agit comme ligand des récepteurs TLR4 (récepteurs Toll-like 4), localisés à la surface des cardiomyocytes environnants. L'activation de ce récepteur induit la signalisation des activateurs transcriptionnels NF- κ B au sein des cardiomyocytes, aboutissant à la production de cytokines, telles que l'interleukine IL-1 β pro-

inflammatoire et le TNF α (tumor necrosis factor α). L'interleukine IL-1 β favorise la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire, tandis que TNF α se fixe et active le récepteur de mort TNFR1 (récepteur au TNF) à la membrane du cardiomyocyte conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Les VE secrétées par les cardiomyocytes, en condition de reperfusion coronaire après infarctus, pourraient donc contribuer aux lésions consécutives à la reperfusion et jouer un rôle délétère dans la récupération des patients (243).

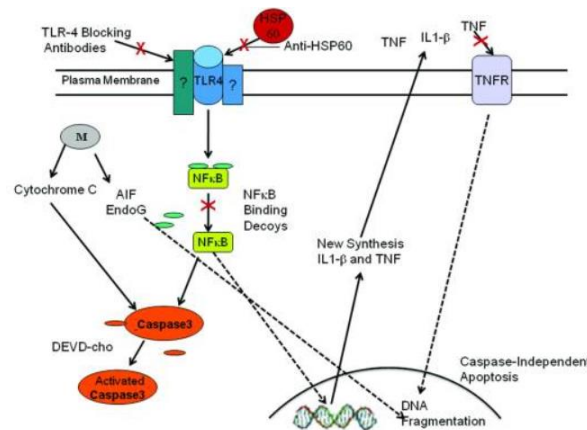


Figure 14 : Représentation de la voie de signalisation apoptotique induite par les exosomes exprimant HSP60 sur les cardiomyocytes (243)

Après un infarctus du myocarde, le remodelage cardiaque peut induire une fibrose et une hypertrophie de l'organe, provoquant une insuffisance cardiaque. L'utilisation d'un modèle murin d'insuffisance cardiaque chronique après infarctus révèle que l'expression du miR-27a est fortement augmentée dans la zone du cœur préservée et dans la circulation sanguine. *In vitro*, les fibroblastes cardiaques sécrètent des exosomes particulièrement enrichis en miR-27a en réponse à l'angiotensine II. Ce mode de stimulation semble reproduire le processus observé en modèle murin. La sécrétion de ces VE, qui ciblent les cardiomyocytes, entraîne une diminution de la traduction et de l'expression de la protéine PDLIM5 (PDZ and LIM domain 5), la principale cible du miR-27a (244). PDLIM5 est particulièrement connue pour son rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire (245). Dans les cardiomyocytes, son inhibition se traduit par la modulation positive de l'expression de gènes associés à l'hypertrophie cardiaque. Les exosomes sécrétés par les fibroblastes sains, particulièrement enrichis en miR-27a, semblent donc agir comme des modulateurs paracrines de l'hypertrophie cardiaque à la suite d'un infarctus, première cause d'insuffisance cardiaque chronique (244).

1.7.5. Les maladies respiratoires

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique se manifestant par des difficultés respiratoires liées à l'hyperréactivité et le remodelage des voies aériennes. L'obstruction des voies respiratoires est alors provoquée par l'hypertrophie des muscles lisses, une fibrose, ainsi qu'une angiogenèse accrue. Deux types d'asthme se distinguent en fonction de la nature du déclencheur

de l'inflammation. L'asthme extrinsèque est provoqué par une inflammation induite par un allergène, tandis que l'asthme intrinsèque se manifeste sous l'effet d'une inflammation liée à d'autres facteurs non allergènes, tels que le stress, l'exercice ou une infection. Même si les mécanismes moléculaires de l'inflammation sont similaires, l'asthme intrinsèque est une forme d'asthme plus sévère que l'asthme extrinsèque et aucun traitement n'est à ce jour efficace.

Les VE sécrétées par les granulocytes éosinophiles, extraites à partir du sang de patients atteints d'asthme, induisent l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires (pneumocytes). L'apoptose de ces cellules est provoquée par l'inhibition de la signalisation JAK-STAT (« Janus kinase-signal transducer and activator of transcription ») (246-248). En parallèle, les VE stimulent la libération de cytokines pro-inflammatoires comme TNF et la chimiokine CCL26, contribuant à l'inflammation des voies respiratoires. Dans un second temps, ces VE favorisent la prolifération des pneumocytes par activation de la signalisation PI3Kinase/Akt, contribuant au remodelage des voies pulmonaires. Les VE libérées par les granulocytes éosinophiles ciblent également les cellules musculaires lisses. Elles modulent positivement la signalisation des MAP kinases ERK1/2. L'augmentation de l'expression du facteur de croissance VEGF-A et du récepteur à la chimiokine CCR3 qui en découlent favorisent la prolifération de ces cellules. Les VE, en altérant le fonctionnement des cellules pulmonaires, participent donc à l'inflammation, au développement de la fibrose et aux remodelages des voies respiratoires, caractéristiques de l'asthme (246).

I.7.6. Les maladies métaboliques

De nombreuses études s'accordent sur l'implication des VE sécrétées par les tissus adipeux dans le développement de maladies métaboliques associées à l'obésité, en particulier dans le diabète gestationnel et les complications associées. Le diabète gestationnel est un trouble de l'intolérance au glucose se déclarant au cours de la grossesse, et qui se caractérise donc par une hyperglycémie. Plus de 50% des femmes atteintes d'obésité développent un diabète gestationnel. Par conséquent, l'augmentation de l'obésité dans la société accroît le nombre de cas de diabète gestationnel. Ces femmes ont un risque important de diabète de type 2 au cours de leur vie. De plus, les fœtus qui se développent sous diabète gestationnel présentent également des complications telles qu'un risque élevé d'obésité et de maladies métaboliques à l'âge adulte.

Chez la femme souffrant de diabète gestationnel, les tissus adipeux sécrètent des exosomes en quantité plus importante et de composition différente par rapport à des individus sains (249, 250). Par leur composition, ces exosomes perturbent l'expression de 47 gènes au sein de cellules réceptrices du placenta, majoritairement impliqués dans le métabolisme du glucose, comme *HK3* (hexokinase 3), *TPI1* (triosephosphate Isomerase 1), *PCK1* (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) et *G6PC* (glucose-6-phosphate catalytic subunit). Ces exosomes diminuent également le fonctionnement mitochondrial en perturbant des protéines comme la sirtuine (SIRT). De plus, ils

modulent positivement les voies de signalisation de transfert des nutriments au fœtus, telles que la signalisation de mTOR (mammalian target of rapamycin) (251). Les exosomes libérés par les adipocytes jouent donc un rôle dans la communication entre le tissu adipeux et le placenta, favorisant le métabolisme du glucose et le transport de nutriments au fœtus. Ces processus contribuent au développement de l'intolérance au glucose et de l'hyperglycémie caractéristiques du diabète gestationnel chez la femme, et aboutissent à une augmentation du poids de naissance du fœtus. En effet, il est également démontré que l'augmentation du poids de naissance est directement corrélée à l'augmentation de la quantité d'exosomes libérés par les tissus adipeux, renforçant encore l'évidence de leur implication dans la pathologie et les complications associées (251).

1.7.7. Les cancers

Les cellules cancéreuses sécrètent des VE par le biais desquelles elles peuvent altérer le fonctionnement des cellules cancéreuses voisines ou appartenant au microenvironnement (cellules immunes, endothéliales, fibroblastiques) et affecter les différentes étapes du développement tumoral. Dans de multiples cancers, les VE modifient le microenvironnement tumoral et favorisent l'initiation, la croissance tumorale, la néovascularisation, l'échappement immunitaire et la résistance aux thérapies anti-cancers. Au-delà des effets sur le microenvironnement local, les VE, grâce à leur capacité de dispersion via les fluides de l'organisme, favorisent la dissémination métastatique et le développement de niches au sein d'organes cibles (252, 253). Dans cette section, différents exemples seront présentés, démontrant le rôle majeur des VE dans les différentes composantes du processus de progression tumorale et des différents types de cancers.

1.7.7.1. L'acquisition du phénotype cellulaire agressif et la croissance tumorale

Au cours du processus morphogénique d'acquisition du phénotype agressif, les cellules perdent leurs caractéristiques initiales pour acquérir des propriétés de cellules tumorales, comme des capacités de motilité et d'invasion cellulaires. L'acquisition de ces propriétés correspond à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). De plus, l'échappement de ces cellules à des processus de sauvegarde, comme l'apoptose ou la sénescence, donne naissance à des cellules hyper-prolifératives, à l'origine d'une évolution progressive du stade bénin au cancer, et stimule la croissance tumorale (254).

Les VE dérivées des cellules cancéreuses peuvent induire des altérations du transcriptome des cellules saines adjacentes par la transmission de microARNs. Les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses colorectales SW480 expriment et transmettent aux cellules saines voisines le miR-21. Le miR-21 exogène induit l'inhibition du gène suppresseur de tumeur PDCD4 (programmed cell death 4) dans les cellules saines réceptrices, à l'origine d'une inhibition de

l'apoptose. L'échappement de ces cellules à l'apoptose leur confère des propriétés hyperprolifératives, contribuant à l'initiation de la TEM (255). Parmi les ARNs non codants, les lncARNs (« long non-coding RNA ») semblent également impliqués dans l'acquisition des propriétés agressives des cellules pré-cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses de l'adénocarcinome pancréatique sécrètent des VE contenant le lncARN Sox2ot (Sox2 overlapping transcript), qui induisent des modulations de l'expression génétique, en particulier, une augmentation de l'expression des marqueurs de la TEM dans les cellules pré-cancéreuses réceptrices (256, 257).

D'autres molécules exprimées par les VE peuvent être associées à un effet pro-tumoral. Par exemple, les cellules cancéreuses colorectales HT29 et Caco-2 libèrent des exosomes enrichis en tétraspanine CD133. Ces exosomes induisent dans la cellule réceptrice l'activation de la tyrosine kinase Src qui stimule la cascade de signalisation des MAPK (258). Ce mécanisme moléculaire est alors responsable de la TEM des fibroblastes sains Rat-1, par stimulation de l'expression des gènes de la TEM dans ces cellules. De plus, ils induisent une augmentation de la prolifération et de la motilité des fibroblastes sains Rat-1, mais également de cellules cancéreuses colorectales HCT116 (131).

La protéine Wnt4 apparaît comme un autre composant majeur des VE dérivées des cellules cancéreuses colorectales HT29 et HCT116. Lorsque la protéine Wnt4 est transmise aux cellules saines environnantes, elle active la voie de transactivation de la β -caténine qui favorise la TEM de ces cellules (259). La vimentine est également une protéine qui contribue aux propriétés oncogéniques des exosomes libérés par les cellules cancéreuses du poumon PC14. Ces exosomes initient la TEM par une perte de la polarité cellulaire et favorisent la migration et l'invasion des cellules de la lignée bronchique humaine HBEC (260).

Par ailleurs, les VE sécrétées par les cellules cancéreuses peuvent transférer des récepteurs oncogéniques comme EGFR, fortement exprimé dans certains glioblastomes. Ce transfert aux cellules réceptrices induit le déclenchement des voies de signalisation de prolifération et de migration cellulaires associées aux MAPK et à Akt. Il est également responsable de modifications d'expression génétique, notamment de Bcl-xL et de p27, inhibant l'apoptose et favorisant la prolifération respectivement (261).

Outre les VE libérées par les cellules cancéreuses, certaines cellules du microenvironnement tumoral contribuent à la prolifération tumorale par le biais de la sécrétion de VE.

Les fibroblastes associés au cancer (CAFs: « cancer-associated fibroblasts ») sont des composants essentiels du microenvironnement tumoral. Les cellules cancéreuses sont responsables de la conversion des fibroblastes normaux en CAFs. Réciproquement, les échanges, en particulier via les VE, entre les CAFs et les cellules cancéreuses soutiennent la progression tumorale (262-265). Plus spécifiquement, les CAFs sécrètent des VE qui se caractérisent par un enrichissement en annexin A6 et en tétraspanine CD9. Une étude menée par le groupe de recherche de R. Tomasini démontre que la tétraspanine CD9, alors localisée à

la surface des VE, assure leur absorption par les cellules cancéreuses d'adénocarcinome pancréatique. L'absorption de ces VE induit l'activation de la signalisation associée aux MAPK, favorisant la TEM des cellules réceptrices et leur migration. Ces VE contribuent à l'acquisition du phénotype cellulaire agressif, et par conséquent, à la progression tumorale (266, 267).

Les VE sécrétées par les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement tumoral contiennent donc une grande diversité de molécules leur conférant des propriétés oncogéniques. Elles sont alors capables d'affecter le fonctionnement des cellules saines environnantes ou des cellules cancéreuses elles-mêmes au profit de la croissance tumorale. Ces VE soutiennent et renforcent alors la prolifération des cellules cancéreuses, amplifiant encore davantage le développement de la tumeur.

1.7.7.2. L'AIP (« Apoptosis-induced proliferation ») dans le développement tumoral

Le développement de cancers peut être initié par un déséquilibre de la balance entre le renouvellement et la mort cellulaire, la prolifération étant favorisée et la mort cellulaire inhibée. L'induction de la mort cellulaire des cellules cancéreuses est donc un mécanisme efficace d'élimination tumorale. Cependant, cette vision simpliste de l'apoptose comme un mécanisme suppresseur de tumeur ou préventif du développement tumoral est progressivement remise en question. Plusieurs études récentes ont montré que la mort par apoptose des cellules tumorales peut, dans certains cas, promouvoir la croissance tumorale. L'échec de l'apoptose en tant que mécanisme suppresseur de tumeur s'explique donc en partie par cette prolifération compensatoire des cellules cancéreuses (268).

De manière générale, les cellules apoptotiques sont capables d'induire la prolifération et la régénération des cellules viables environnantes, via la sécrétion d'une myriade de signaux mitogènes, incluant des VE apoptotiques. Ce processus correspond à la prolifération induite par l'apoptose (AIP : « apoptosis-induced proliferation »). En contexte physiologique, l'apoptose des cellules épithéliales induit notamment la sécrétion, dépendante de la caspase-3, de corps apoptotiques enrichis en protéine Wnt8a. Ces corps apoptotiques, par l'induction de la signalisation Wnt des cellules souches épithéliales réceptrices, induisent leur prolifération compensatoire afin d'assurer le renouvellement cellulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire (214).

Le rôle majeur des caspases dans la sécrétion de ces mitogènes et l'induction de la prolifération compensatoire apparaît de plus en plus évident (268, 269). Il est démontré que la perte de fonction de la caspase-3 dans les cellules cancéreuses inhibe les mécanismes de repopulation tumorale médiés par le processus d'AIP à la suite d'un traitement par radiothérapie (270).

En effet, l'enjeu majeur réside dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui soutiennent l'AIP en contexte pathologique, en particulier dans le cadre de la prolifération tumorale et

de la résistance aux thérapies anti-cancers. Cependant, nous n'avons répertorié que deux études qui approfondissent le rôle des VE apoptotiques dans la prolifération compensatoire pro-tumorale et qui proposent un mécanisme précis (271, 272).

La première étude révèle la sécrétion de la protéine adaptatrice oncogène Crkl (ADP-ribosylating Crkl adaptor protein) au sein de microvésicules apoptotiques. L'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses HeLa par *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin T est responsable de la sécrétion de ces microvésicules, dépendante de l'activation de la caspase-3. Ces microvésicules induisent la division cellulaire des cellules cancéreuses réceptrices, favorisant la prolifération cellulaire en compensation de l'apoptose des cellules cancéreuses environnantes. Les mécanismes moléculaires exacts de l'induction de la division de la cellule réceptrice ne sont pas clairement établis. Cependant, cette étude propose un mécanisme dépendant de l'activation de la voie de signalisation JNK (c-Jun amino-terminal kinase) (271).

La seconde étude démontre que l'apoptose des cellules cancéreuses de glioblastomes murins et humains provoque la libération d'apo-exosomes enrichis en différents composants du spliceosome. Le transfert de ces composants par les apo-exosomes, en particulier du facteur d'épissage RBM11 (RNA binding motif protein 11), semble induire la perturbation de l'épissage des ARNs des cellules saines environnantes réceptrices. RBM11 serait susceptible de promouvoir un épissage alternatif de MDM4 (murine double minute 4) et le la cycline D1 en faveur de l'expression de leurs isoformes aux propriétés oncogéniques. Ce processus provoque l'acquisition d'un phénotype migratoire agressif par les cellules initialement saines, à l'origine de la régénération des cellules cancéreuses éliminées, de la prolifération tumorale, et promeut la résistance aux thérapies (272).

Les cellules cancéreuses apoptotiques sécrètent donc des VE aux propriétés mitogènes capables d'induire la régénération et la prolifération compensatoire des cellules cancéreuses. Ce processus, qui reste encore largement à approfondir, apparaît comme une entrave majeure à l'efficacité des thérapies anti-cancers et une cause de résistance aux traitements. Paradoxalement, il constitue également une potentielle cible pour l'amélioration de l'efficacité des thérapies anti-cancers.

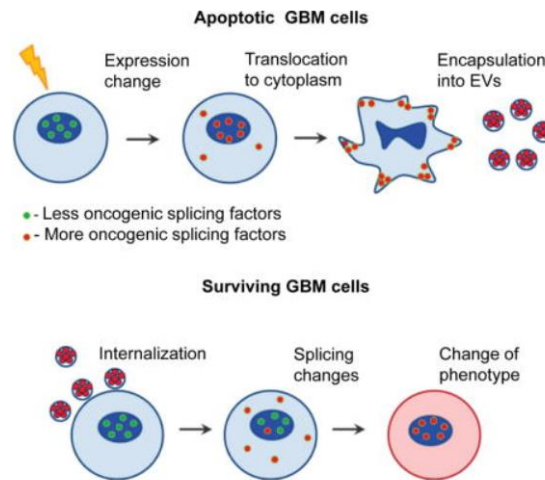


Figure 15 : Acquisition du phénotype migratoire agressif de cellules saines par transfert du facteur d'épissage RBM11 via les apo-exosomes (272)

1.7.7.3. L'angiogenèse et la vascularisation tumorale

L'angiogenèse tumorale assure le développement d'une vascularisation nécessaire à l'irrigation des cellules cancéreuses. Les VE sont impliquées dans le développement de cette vascularisation tumorale par transfert de molécules pro-angiogéniques et l'activation de signalisations angiogéniques. Réciproquement, tout comme l'acidité du microenvironnement tumoral, l'hypoxie associée aux anomalies du réseau vasculaire tumoral favorise la sécrétion et la circulation des VE, et donc la prolifération des cellules cancéreuses. Ces VE sont particulièrement enrichies en facteurs de croissance endothéliale comme VEGF, ainsi qu'en microARNs, à l'origine de l'angiogenèse (261, 273-275).

Il a été démontré *in vitro* que les exosomes produits par les cellules cancéreuses colorectales HM7 expriment et transfèrent aux cellules endothéliales humaines non-immortalisées (HUVEC) le miR-9 (275). Le miR-9 exogène réduit l'expression du suppresseur de signalisation de la cytokine SOCS5, induisant l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT. Au sein des cellules endothéliales, ce mécanisme moléculaire stimule la migration cellulaire et l'angiogenèse. A l'inverse, l'inhibition de cette signalisation abolit la migration cellulaire *in vitro*, et de manière intéressante, induit une diminution de la masse tumorale *in vivo*. De plus, la forte expression de miR-9 dans les cellules cancéreuses colorectales HM7 stimule la transcription et l'expression du facteur de croissance endothéliale VEGF, favorisant sa dispersion via les VE dérivées de ces cellules cancéreuses (275).

En condition d'hypoxie, différentes lignées de cellules cancéreuses du myélome multiple sécrètent des VE enrichis en miR-135b. Le transfert du miR-135b aux cellules endothéliales HUVEC induit l'inhibition de l'expression du facteur HIF-1 α (hypoxia-inducible factor -1 α), favorisant l'angiogenèse. Cette néovascularisation permettrait donc d'améliorer l'oxygénation de la tumeur (276).

L'augmentation de la perméabilité de la vascularisation tumorale est induite par les cellules cancéreuses elles-mêmes dans le but de faciliter leur dissémination. En accord avec cette observation, il a été montré que les VE sécrétées par la lignée cellulaire de cancer colorectal SW620, en plus d'induire l'acquisition d'un phénotype agressif par les cellules saines, provoquent une altération de la perméabilité des cellules endothéliales HUVEC (277). La fusion de ces VE avec les cellules endothéliales induit l'activation de la voie de signalisation RhoA/ROCK responsable d'une altération des jonctions cellulaires, provoquée par la diminution drastique de l'expression de la cadhérine vasculaire endothéliale, la VE-cadhérine. La perte de stabilité endothéliale a pour conséquence une hyperperméabilité vasculaire, caractéristique de la vascularisation tumorale, et qui est particulièrement propice à la dissémination des cellules cancéreuses depuis la tumeur primitive vers de potentielles niches métastatiques (277).

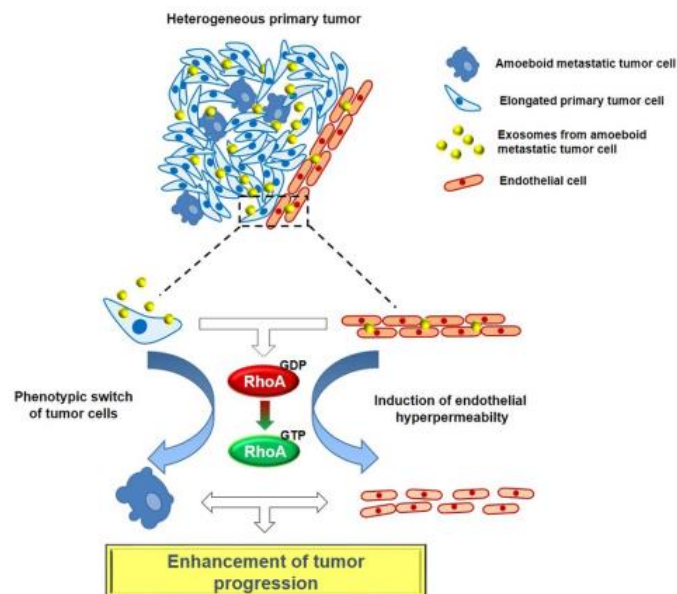


Figure 16 : Représentation de la croissance tumorale et de l'hyperperméabilité vasculaire médiées par les VE (277)

1.7.7.4. La dissémination métastatique

La dissémination métastatique d'un cancer correspond à la migration puis à l'implantation de cellules cancéreuses issues de la tumeur initiale au niveau d'un autre organe. Les cellules métastatiques utilisent les circulations sanguine et lymphatique pour migrer jusqu'à leur site d'implantation. Ces capacités de dispersion et d'adaptabilité lui sont conférées par sa plasticité phénotypique et fonctionnelle, caractéristique des cellules cancéreuses. Si les cellules cancéreuses sont capables par elles-mêmes d'initier le développement de niches pré-métastatiques, les VE qu'elles sécrètent participent grandement à ce processus (278-280). En effet, en tant qu'acteurs majeurs de la communication inter-cellulaire à l'échelle de l'organisme, les VE dérivées des cellules cancéreuses optimisent le développement de métastases par leur

propre dispersion, particulièrement efficace au regard de celle des cellules cancéreuses (252, 279, 281).

L'étude de A. Hoshino et al. démontre que les exosomes dérivés des lignées cellulaires de cancers du sein et du pancréas permettent le développement de métastases au sein d'organes spécifiques, du fait de leur spécificité de ciblage et d'absorption par les cellules des organes cibles, *in vitro* et *in vivo*. Les intégrines exprimées par les exosomes issus des cellules cancéreuses sont responsables de cette spécificité de ciblage et d'absorption. Tandis que les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 6\beta 1$, par la liaison à la laminine des cellules réceptrices, ciblent le tissu pulmonaire et permettent l'adhésion des exosomes aux cellules du poumon, l'intégrines $\alpha v\beta 5$ permet le ciblage et leur adhésion aux cellules du foie. Ce ciblage des exosomes tumoraux induit le développement de niches pré-métastatiques préférentiellement au sein de ces organes (281, 282).

De plus, une analyse transcriptomique réalisée sur les macrophages Kupffer du foie, au préalable traités avec les exosomes dérivés de cellules cancéreuses pancréatiques BxPC-3-LiT, révèle la modulation positive de l'expression des gènes *S100* pro-inflammatoires, incluant les gènes *S100A8* et *S100P*, dont l'expression est 4 fois plus forte. Certains gènes *S100*, considérés comme caractéristiques des cellules métastatiques (*S100A4*, *-A6*, *-A10*, *-A11*, *-A13* et *-A16*) présentent une augmentation de plus de 5 fois de leur expression dans des fibroblastes traités avec des exosomes issus des cellules 4175- LuT de cancer du sein (281).

A l'échelle moléculaire, le tropisme des exosomes issus des cellules 4175- LuT de cancer du sein pour le tissu pulmonaire s'exerce via l'intégrine ITG $\beta 4$ localisée à la surface des exosomes, qui se lie à la laminine au niveau de la lame basale cellulaire. Cette interaction provoquerait la phosphorylation et l'activation de la tyrosine kinase Src, ainsi que l'activation de Akt et des facteurs de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cell), responsables de perturbations de l'expression génétique au sein des cellules pulmonaires, et notamment de la modulation positive de l'expression de *S100A4* (281, 283).

Outre leur propriété d'adhésion qui contribue à l'organotropisme des exosomes, les intégrines exosomales sont donc responsables de l'acquisition de phénotypes pro-inflammatoire et pro-migratoire par les cellules des tissus cibles. Ainsi, les intégrines favorisent le développement de la niche pré-métastatique en affectant l'expression génétique des cellules cibles au sein d'organes distants. Par conséquent, les intégrines exprimées par les exosomes pourraient servir de biomarqueurs pour prévenir le développement de métastases ou déterminer l'organe atteint (131, 281).

Les cellules du microenvironnement tumoral sécrètent également des VE qui participent à la dissémination métastatique. Il est démontré que les CAFs sont à l'origine d'une production accrue de microvésicules qui induisent des modulations de l'expression protéique des cellules cancéreuses, affectant leur fonctionnement cellulaire (262-265). Au niveau moléculaire, les CAFs

expriment fortement la protéine Galectin-1 (Gal-1) et libèrent donc des microvésicules enrichies en Gal-1. Gal-1 est connue pour son implication dans la modulation des interactions intercellulaire et entre cellule et matrice extracellulaire, ainsi que dans la régulation de la prolifération cellulaire et de nombreux processus du développement tumoral (284-286). Lorsque les microvésicules enrichies en Gal-1, libérées par des fibroblastes cutanés ou prostatiques, sont captées par les cellules cancéreuses, en particulier des cancers du pancréas et de la prostate, elles provoquent une augmentation de la concentration intracellulaire de Gal-1 au sein des cellules cancéreuses. Ce processus stimule la migration des cellules cancéreuses, et par conséquent favorise la progression tumorale. Les CAFs renforcent donc le potentiel invasif des cellules cancéreuses via la protéine Gal-1 transférée spécifiquement au sein de microvésicules (287). Le transfert par le biais des microvésicules semble particulièrement efficace sur la modulation phénotypique des cellules cancéreuses au regard de l'effet induit par la protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire (287). En effet, les microvésicules sont susceptibles d'optimiser le transfert de molécules actives en préservant leur potentiel fonctionnel ou en assurant un ciblage efficace des cellules réceptrices par le biais de molécules d'interaction à leur surface (281, 282).

Enfin, un ensemble de microARNs exosomaux sécrétés par les cellules cancéreuses semblent jouer un rôle dans la dissémination des cellules cancéreuses au profit du développement de métastases. Par exemple, les microARNs miR-21-5p, miR-100-5p et miR-139-5p, enrichis dans les exosomes libérés par les cellules cancéreuses prostatiques semblent conférer des propriétés pro-migratoires aux cellules, favorisant la dissémination des cellules cancéreuses elles-mêmes (288).

1.7.7.5. L'échappement au système immunitaire

Le système immunitaire contrôle en permanence l'intégrité des cellules de l'organisme. Les cellules cancéreuses présentent à leur surface des antigènes modifiés, reconnus par le système immunitaire comme étrangers à l'organisme. Une réponse immunitaire anti-tumorale se met alors en place et le système immunitaire lutte pour l'élimination des cellules tumorales. Cependant, au fur et à mesure du développement tumoral, les cellules cancéreuses parviennent à mettre en place des mécanismes d'échappement au système immunitaire. Pour cela, les cellules cancéreuses peuvent être faiblement immunogènes, en ne présentant que très peu, voire aucun antigène de surface. Nous allons voir que les VE peuvent jouer, par différents biais, un rôle important dans les mécanismes d'échappement au système immunitaire (272).

L'élimination des cellules immunes en charge de l'élimination des cellules cancéreuses, comme les lymphocytes cytotoxiques, a été associée aux exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses. Du fait des enjeux de la compréhension de ces mécanismes pour la lutte contre le

cancer, plusieurs études ont analysé le rôle de ces exosomes dans l'échappement des cellules de divers types de cancers au système immunitaire.

Par exemple, les exosomes issus de plusieurs lignées cellulaires de cancer colorectal, ou isolés à partir du sang de patient, sont capables d'induire l'élimination par apoptose des lymphocytes T CD8+, acteur majeur de l'immunité adaptative et de la lutte contre le développement tumoral (289). Ces exosomes expriment FasL et TRAIL, deux ligands des récepteurs de mort cellulaire de la superfamille des TNFR, Fas et DR4/5 respectivement. La fixation des exosomes tumoraux aux lymphocytes T, via l'interaction ligands/récepteurs, conduit à l'activation des récepteurs de mort et à l'élimination des lymphocytes T par apoptose, favorisant l'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire (289).

Les exosomes dérivés de cellules du cancer du poumon NSCLC (« non-small cell lung cancer ») sont également impliqués dans l'échappement des cellules cancéreuses à la surveillance anti-tumorale médiée par les lymphocytes T CD8+. Ces exosomes expriment le ligand PD-L1 de la protéine 1 de mort cellulaire programmée PD-1 (programmed cell death protein-1), exprimée à la surface des lymphocytes T activés. Le système PDL-1/PD-1 joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, favorisant l'auto-tolérance et limitant l'activité pro-inflammatoire du système immunitaire. Les exosomes dérivés des cellules cancéreuses du poumon exprimant PDL-1 induisent la mort cellulaire par apoptose des lymphocytes T CD8+ par interaction directe PDL-1/PD-1. Cette interaction est également responsable de la perturbation du fonctionnement des lymphocytes T CD8+, provoquant la diminution de la sécrétion de la cytokine IFN- γ (interféron- γ). En parallèle, le système PDL-1/PD-1 est responsable de la prolifération des cellules cancéreuses et la diffusion de PDL-1 via les exosomes renforce l'efficacité de ce mécanisme pro-tumoral (290).

De plus, le ligand PDL-1 localisé à la surface des exosomes sécrétés par les cellules de carcinome pulmonaire de Lewis ou par les cellules 4T1 du cancer du sein est responsable de l'inhibition de la différenciation des cellules myéloïdes progénitrices en cellules dendritiques inflammatoires CD11c+ et de leur migration au niveau du site de la tumeur. Ce processus empêche l'activation et le recrutement des cellules immunitaires effectrices, en particulier des lymphocytes T cytotoxiques, et donc la mise en place de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces exosomes induisent l'élimination des cellules dendritiques par apoptose via l'interaction PDL-1/PD-1. En revanche, ces exosomes favoriseraient le recrutement des lymphocytes T régulateurs au sein du microenvironnement tumoral. Ces lymphocytes contribueraient à limiter la réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses, alors perçues comme des cellules « du soi » (291, 292).

Enfin, les microARNs contenus dans les exosomes dérivés de cellules cancéreuses peuvent contribuer à leur échappement au système immunitaire (293). L'étude de J. Zhou et al. démonte que les exosomes libérés par les cellules B-16 de mélanome murin contiennent des microARNs, notamment le miR-690, qui semblent induire des modulations de l'expression génétique. L'expression des protéines pro-apoptotiques, incluant les caspases -3, -7 et -9, est alors augmentée, tandis que l'expression des protéines anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-xL et MCL-1, est diminuée au sein des lymphocytes T CD4+. Ces perturbations de l'expression des protéines de la signalisation apoptotique favoriseraient l'élimination des lymphocytes T CD4+ via le déclenchement de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale (294).

Les miR-24-3p, miR-891a, miR-106a-5p, miR-20a-5p et miR-1908 sont d'autres exemples de microARNs qui semblent conférer aux exosomes issus des cellules TW03 de carcinome nasopharyngé leur capacité d'atténuation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Selon des mécanismes qu'il reste à préciser, les exosomes seraient responsables de l'inhibition de la différenciation et de la prolifération des lymphocytes T. De plus, ces exosomes altéreraient leur fonctionnement en modulant négativement la sécrétion de cytokines IL-2, IFN- γ , et IL-17 (295).

1.7.7.6. La résistance aux thérapies anti-tumorales

La chimiothérapie anti-cancéreuse est basée sur l'utilisation de plusieurs composés qui ont prouvé leur efficacité dans l'élimination des cellules cancéreuses. La chimiothérapie peut être utilisée seule ou en association avec d'autres traitements tels que la radiothérapie. Cependant, l'échec du traitement de nombreux cancers persiste encore du fait de la forte capacité intrinsèque de résistance des cellules cancéreuses aux traitements. La sécrétion de certaines VE par les cellules cancéreuses a été montrée pour contribuer à cette résistance.

Certains microARNs, comme les miR-222 et miR-223, exprimés par les exosomes libérés par les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et T47D, favorisent l'entrée en dormance temporaire des cellules tumorales de niches pré-métastatiques. Ces cellules entrent en phase G0 du cycle cellulaire, diminuant drastiquement leur sensibilité à la chimiothérapie. La mise en place de ce mécanisme de survie évolutif par les cellules cancéreuses, à laquelle contribuent grandement les VE, leur confère la capacité de continuer à se diviser lentement, tout en étant dans un état dormant qui les préserve des effets délétères de la chimiothérapie (296).

Les exosomes libérés par certaines cellules cancéreuses sont également enrichis en miR-451 et en miR-27a. Ces microARNs exosomaux stimulent l'expression du gène *MDR1* (multidrug resistance protein 1) via l'activation de la signalisation NF- κ B dans la cellule réceptrice. Le gène *MDR1* code pour le transporteur de molécules thérapeutiques P-gp (P-glycoprotein). La modulation positive de P-gp dans les cellules cancéreuses favorise l'expulsion des médicaments anti-tumoraux. Le transporteur de molécules thérapeutiques P-gp est impliqué dans plus de 50% des cas de résistance aux thérapies anti-cancers. Une vingtaine de médicaments cytotoxiques,

incluant Paclitaxel et Doxorubicine, sont évacués des cellules cancéreuses par ce transporteur (297, 298).

De plus, P-gp peut être exprimé à la membrane des exosomes en orientation inversée, permettant l'influx de molécules thérapeutiques au sein des exosomes. L'empaquetage des médicaments au sein des exosomes permet leur relargage hors de la cellule par sécrétion exosomale. L'élimination des molécules thérapeutiques médiées par les VE est un mécanisme efficace qui contribue à la résistance aux thérapies anti-cancers (297, 299).

Certaines molécules thérapeutiques agissent par le biais de la stimulation de l'apoptose des cellules cancéreuses, souvent utilisées en combinaison avec d'autres médicaments pour accroître leur cytotoxicité. Cependant, la résistance à ces traitements inducteurs de l'apoptose peut être provoquée par la réduction du niveau d'expression des protéines pro-apoptotiques au sein des cellules cancéreuses, du fait de certaines mutations affectant leur gène, ainsi que notamment par l'élimination de la caspase-3 au sein de microvésicules (300-305). En effet, la sécrétion de microvésicules chargées en caspase-3 permet le passage des cellules cancéreuses en condition anti-apoptotique, les rendant peu sensibles aux molécules inductrices de l'apoptose administrées aux patients. La sécrétion de ces microvésicules est potentiellement dépendante de la caspase-3 mais indépendante du clivage de ROCK 1 par cette dernière, qui est impliqué dans l'augmentation de la production des microvésicules durant l'apoptose (148, 300). Le processus moléculaire exact de biogenèse et d'incorporation de la caspase-3 dans ces microvésicules reste donc à élucider (300).

Par ailleurs, tandis que la lignée cellulaire cancéreuse colorectale RKO est résistante au traitement anti-cancer au Cetuximab, la lignée cellulaire cancéreuse colorectale Caco-2 y est sensible. En revanche, la coculture des cellules Caco-2 avec les exosomes sécrétés par les cellules résistantes RKO, permettrait leur viabilité au contact du Cetuximab. Les cellules Caco-2 pourraient donc acquérir une propriété de résistance au traitement. A l'échelle moléculaire, la mise en contact des cellules sensibilisées avec ces exosomes semble induire une régulation négative de l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN (phosphatase and tensin homolog) et une modulation positive de la phosphorylation d'Akt. Ces mécanismes protecteurs favoriseraient non seulement la survie, mais augmenteraient la prolifération des cellules cancéreuses. Les VE semblent donc capables d'induire la résistance aux traitements anti-cancers de cellules initialement sensibles (306).

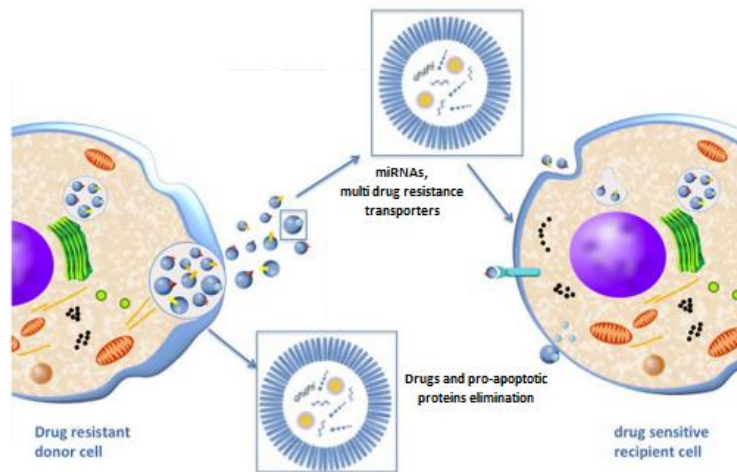


Figure 17 : Les exosomes sont responsables de la thérapie résistance des cellules sécrétrices et réceptrices (adaptée de Steinbichler et al. (297))

I.8. Les techniques d'étude des VE : production, purification, analyse

I.8.1. Les méthodes d'induction des VE

Les VE sont collectées à partir de matériel biologique humain, comme le sang, l'urine, la salive, la transpiration et le liquide cébrospinal. Dans la plupart de ces prélèvements, le taux de VE est, en général, très faible. Si l'optimisation des méthodes d'extraction permet désormais leur concentration, les quantités limitées de VE obtenues à partir de biopsies de liquides humains restreignent leur analyse au diagnostic de pathologies. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires associés à leur biogenèse, de déterminer leur composition et/ou d'étudier leurs fonctions, l'élaboration de méthodes pour produire des VE *in vitro* a été nécessaire. Cette production doit être contrôlée, notamment à un instant imposé et en quantité suffisante. Des méthodes d'induction ou de stimulation de la production de VE ont alors été mises au point afin de répondre aux besoins des expérimentations. En premier lieu, le type cellulaire de production des VE est un paramètre à choisir avec soin. Si les cellules dendritiques sécrètent peu de VE, les cellules souches mésenchymateuses, quant à elles, en produisent en grande quantité (307). Des modifications génétiques des cellules peuvent optimiser leur sécrétion de VE. Les cellules productrices de VE, EXOtic, surexpriment une combinaison de 3 gènes STEAP3-SDC4-NadB qui multiplie par 15 le taux de VE sécrétées (308). Certaines conditions biologiques peuvent également favoriser la libération de VE, comme le taux de confluence des cellules. Les cellules confluentes sécrètent davantage de VE que les cellules éparses (309). De plus, des signaux ou facteurs de stress induisent ou modulent positivement la production des VE, tels que la déprivation en sérum, l'hypoxie, le détachement cellulaire, ou encore les influx calciques (310). Enfin, la production des VE étant particulièrement amplifiée au cours de la mort cellulaire par apoptose, des traitements des cellules avec des inducteurs de la mort cellulaire sont réalisés, comme les ligands de récepteurs de mort ou l'inducteur chimique Staurosporine (22). L'ensemble

de ces méthodes a permis la réalisation d'analyses à grande échelle, avec un rendement important, et a donc contribué aux avancées de la recherches dans le domaine des VE.

I.8.2. Les méthodes de purification des VE

Les VE sont présentes dans les milieux biologiques. Ces milieux contiennent également des complexes macromoléculaires, des agrégats protéiques, des débris cellulaires, voire des cellules en suspension. Ces conditions rendent particulièrement complexes l'isolement et la purification des VE. Certaines approches permettent de les collecter, les concentrer et les analyser de manière fiable et reproductible. Cependant, toutes ces techniques présentent des limites, parfois non négligeables. Le choix de la méthode d'isolement des VE doit donc être fait avec précaution en fonction du type d'étude envisagée. L'association de différentes techniques complémentaires peut également permettre d'affiner les analyses, ainsi que des optimisations propres à chaque expérimentation.

I.8.2.1. La purification des VE basée sur la densité

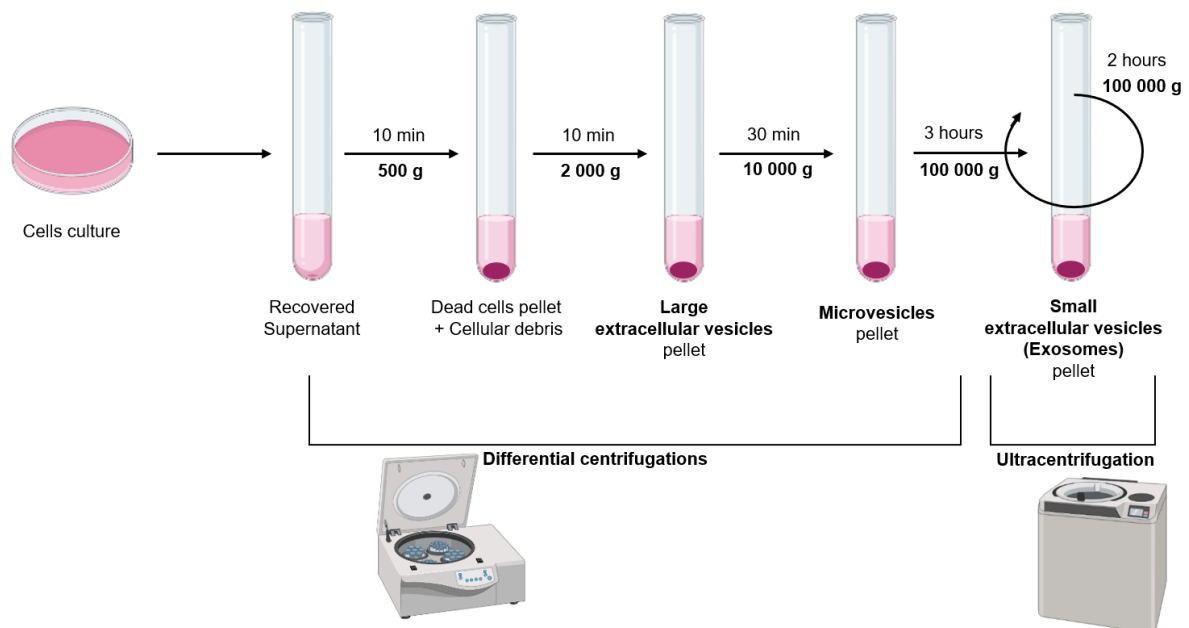
Ultracentrifugation différentielle

L'ultracentrifugation différentielle a été la première méthode utilisée pour l'isolement des VE. Cette technique repose sur des différences de densité des composants de milieux biologiques. Une succession de plusieurs centrifugations à des vitesses croissantes permet de culoter les composants de moins en moins denses contenus dans le fluide. La durée et la vitesse des centrifugations successives dépendent du type de fluide et du type de VE à isoler. De manière générale, le protocole d'ultracentrifugation différentielle est le suivant et respecte les recommandations faites par la société savante d'étude des VE (International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)) (311):

- une première centrifugation de 10 minutes à 500g afin d'éliminer les cellules mortes en suspension ;
- une seconde centrifugation de 10 minutes à 2000g pour éliminer les débris cellulaires et les complexes macromoléculaires ;
- la troisième centrifugation de 30 minutes à 10 000g permet d'obtenir un culot de VE d'un diamètre considéré supérieur à 200 nm, correspondant aux microvésicules ;
- l'ultracentrifugation de 3 heures à 100 000g permet d'obtenir un culot de VE d'un diamètre considéré inférieur à 200 nm, correspondant aux exosomes ;
- une seconde ultracentrifugation de 2 heures à 100 000g du culot d'exosomes re-suspendu dans du PBS est recommandée afin d'éliminer les agrégats protéiques artéfactuels.

L'ultracentrifugation différentielle est une méthode fiable pour collecter et concentrer de manière reproductible des échantillons de VE. Elle est appropriée pour dissocier efficacement les différentes catégories de VE et pour la réalisation d'études mécanistiques et fonctionnelles à partir de ces échantillons. Durant ces dernières années, le protocole a connu d'importantes

optimisations et assure une correspondance des VE extraites avec les standards actuellement admis pour l'étude des différentes catégories de VE. Cependant, cette technique nécessite du matériel sophistiqué et demande des quantités d'échantillons importantes. Elle ne permet pas d'isoler les VE d'autres composants des milieux biologiques avec des densités similaires, comme certains agrégats protéiques. Elle peut aussi induire la co-agrégation de VE, n'excluant pas que certaines VE de densité intermédiaires soient en partie éliminées lors d'une des étapes de centrifugations successives. Enfin, les contraintes morpho-mécaniques imposées par l'ultracentrifugation ne garantissent pas une parfaite intégrité des VE collectées. Pour l'ensemble de ces raisons, cette technique ne peut pas être appliquée en contexte clinique, mais l'ultracentrifugation reste la technique conventionnelle la plus utilisée à ce jour en recherche fondamentale pour l'étude des VE (7, 312-317).



International Society for Extracellular Vesicles

Figure 18 : Méthode de purification des VE par centrifugations et ultracentrifugation séquentielles

Gradient de densité

La séparation par gradient de densité est une variante de la méthode d'ultracentrifugation, assurant un meilleur rendement de purification. L'isolement spécifique de certaines sous-populations de VE est alors possible. Les VE sont séparées, toujours selon leur caractéristique physique de densité, à travers un gradient, constitué de plusieurs fractions successives de concentrations croissantes. Le sucrose et l'iodixanol (OptiPrep®) sont les plus utilisés. Selon ces paramètres, les VE pénètrent plus ou moins profondément au sein du gradient. La progression des VE au sein du gradient et leur séparation sont permises par la force centrifuge imposée par l'ultracentrifugation de ce dernier à très haute vitesse, entre 100 000g et 200 000g. Les différentes fractions du gradient, contenant chacune une catégorie spécifique de VE isolées, sont

ensuite récupérées et les VE en sont extraites. Cette méthode est particulièrement utilisée dans le cadre des études sur les exosomes, généralement retrouvés dans les fractions dont la densité est comprise entre 1.13 et 1.19 g/mL. Cependant, cette technique nécessite du matériel sophistiqué et les VE sont soumis à d'importantes contraintes morpho-mécaniques (318-321).

1.8.2.2. La purification des VE basée sur la taille

Chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion de taille permet l'isolement des VE et la séparation de leurs différentes catégories en se basant sur leur différence de taille, plus précisément sur leur différence de volume hydrodynamique. En effet, les différentes catégories de VE se caractérisent par leur taille spécifique. Sous écoulement fluide, les VE pénètrent plus ou moins loin dans les pores du gel polymère des colonnes chromatographiques suivant ce paramètre. La chromatographie d'exclusion de taille est peu complexe, peu coûteuse et permet de séparer de manière efficace les VE des agrégats protéiques et autres complexes macromoléculaires. De plus, les contraintes morpho-mécaniques imposées aux VE sont faibles, permettant de préserver leur structure, et potentiellement leurs propriétés biologiques. Cette technique est donc relativement bien adaptée pour la purification de VE dans le cadre d'études fonctionnelles. Cependant, la chromatographie d'exclusion de taille nécessite une dilution des échantillons, parfois déjà faiblement enrichis en VE, et ne permet donc pas leur concentration à l'issue du protocole. De plus, une centrifugation préalable est nécessaire afin d'éliminer les cellules mortes et débris cellulaires susceptibles de boucher la colonne. Enfin, la faible résolution séparative de certains sous-types de VE compromet leur purification via cette technique (322-324).

Filtration et ultrafiltration

La filtration et l'ultrafiltration de milieux biologiques sont d'autres techniques de purification des VE, et de leur séparation des autres composants, basées sur des différences de taille entre les différentes catégories de VE. Cette séparation est réalisée grâce à des membranes semi-perméables nanoporeuses à travers lesquelles s'écoule le milieu biologique sous l'effet d'une pression. En fonction de la taille des pores de la membrane de filtration, les VE sont retenues ou sont filtrées. L'échantillon traverse les filtres sous l'effet d'une pression induite selon différentes méthodes. Les méthodes les plus utilisées sont l'ultrafiltration par centrifugation séquentielle et la filtration par flux tangentiel, pour lesquelles la pression est imposée par une centrifugation et une pompe péristaltique, respectivement. L'ultrafiltration par centrifugation séquentielle consiste en une succession d'étapes de filtration. Une réduction progressive de la taille des pores de la membrane de filtration permet d'isoler et de concentrer les différentes catégories de VE. La filtration par flux tangentiel est une variante de la technique à mentionner pour l'optimisation qu'elle apporte face aux problèmes de colmatages des nanopores des membranes de filtration. Toujours dans un objectif d'optimisation, cette méthode peut être suivie d'une chromatographie

d'exclusion de taille complémentaire. Enfin, la filtration et l'ultrafiltration présentent un risque important de déformations et d'altération de l'intégrité des VE lors de leur passage à travers les filtres, surtout en cas de forte pression de filtration (325-328).

1.8.2.3. La purification des VE basée sur l'affinité

Immuno-affinité

L'immuno-affinité se démarque des méthodes précédentes. En effet, cette technique d'isolement n'est pas basée sur les caractéristiques physiques des VE mais sur une reconnaissance spécifique. Ainsi, elle fournit des indications précieuses sur la nature des VE collectées. Elle utilise des anticorps ou ligands qui lient de manière spécifique les protéines contre lesquelles ils sont dirigés. Il s'agit de protéines exprimées à la surface des VE, en général, appartenant à la superfamille des tétraspanines, notamment CD9, CD63 et CD81, particulièrement enrichies à la surface des exosomes. Les anticorps ou ligands sont conjugués à un support solide (billes, microsphères, plaques 96 puits...) et mis en contact avec l'échantillon. Les VE exprimant la protéine d'intérêt sont alors fixées par l'anticorps ou le ligand, et ainsi spécifiquement collectées. En utilisant une molécule connue pour être spécifiquement exprimée par un type de VE, il est possible de les isoler de manière très sélective. En révélant la présence de certaines molécules exprimées par les VE, cette méthode apporte également des informations sur le mode de biogenèse et l'origine cellulaire de celles-ci, ainsi que sur l'état physiopathologique des cellules sécrétrices. L'immuno-affinité peut donc participer à l'identification d'une sous-population de VE comme potentiel biomarqueur de pathologies. Malgré sa fiabilité et les perspectives thérapeutiques associées, cette méthode s'avère couteuse, car elle requiert généralement l'utilisation de kits commerciaux. Elle est également difficilement adaptable à des échantillons de volume important. Enfin, l'étape suivant la fixation des VE nécessite une dissociation du support par le biais de tampons d'élution, ne garantissant pas l'intégrité des VE (15, 329-331).

1.8.2.4. Les autres méthodes de purification

D'autres méthodes d'isolement de VE ne se basent ni sur la densité, ni sur la taille ou sur l'affinité. *La précipitation induite par des polymères* en fait partie. Ces kits commerciaux reposent sur la précipitation des VE en présence de polymères hydrophiles. Les polymères lient les molécules d'eau induisant la précipitation des composants insolubles comme les VE, ensuite récupérées par centrifugation à basse vitesse (332). *La chromatographie par échange d'ions* est une autre technique d'isolement, basée sur l'état de charge des VE. Cette charge est dépendante des composants membranaires exprimés à la surface des VE et chargés négativement, en particulier les lipides. Les VE sont alors collectées sur différents types de supports anioniques, comme des billes ou des résines (333).

I.8.3. Les méthodes d'analyse des VE

I.8.3.1. Les méthodes d'analyse moléculaire

Western Blot

Le Western blot est l'une des techniques de biochimie les plus utilisées pour la détection et la séparation de protéines, en fonction de leur poids moléculaire. Les échantillons de VE purifiés sont d'abord lysés afin de libérer les protéines, de les rendre accessibles à la détection, et de dissocier les agrégats artéfactuels. Un tampon de lyse, le plus fréquemment un tampon RIPA (10mM Tris/HCl pH 7.2, 150mM NaCl, 1mM Na₂EDTA.2H₂O, 1% TX-100, 0,1% SDS, 1% Na-deoxycholate, 5mM NaF, 1mM Na₃VO₄ et des inhibiteurs de protéases), est utilisé en combinaison d'un mélange d'inhibiteurs de protéases. La préparation des échantillons de VE est une étape cruciale pour assurer l'homogénéisation et la détection optimale des protéines. La concentration totale en protéine d'un échantillon purifié et lysé de VE est ensuite quantifiée par dosages colorimétriques, selon la méthode de Bradford ou la méthode BCA (acide bicinchoninique). Le dosage protéique ne permet pas de rendre compte de la quantité de VE collectées, mais fournit une information sur l'enrichissement global en protéine des échantillons de VE. Sur la base du principe de l'immunochromatographie, chaque extrait est alors déposé sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) selon un volume dépendant de sa concentration globale en protéine, dans un souci de normalisation. Les protéines ainsi séparées par électrophorèse au sein du gel sont ensuite électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées à l'aide d'anticorps spécifiques. Cette détection peut se faire par colorimétrie, chimioluminescence ou fluorescence. Le Western blot permet de démontrer la présence de protéines connues pour être associées aux VE, comme les tétraspanines, mais aussi, d'étendre les recherches à d'autres composants potentiels. Il peut donc apporter des informations pour l'identification et l'analyse du contenu des VE, ainsi que sur de potentielles perspectives fonctionnelles (7, 198, 334).

Analyse par immunoabsorption

L'analyse par immunoabsorption est une technique faisant appel à des kits commerciaux dont le principe est inspiré des tests immuno-enzymatiques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Un anticorps ciblant un marqueur protéique d'intérêt recouvre un support solide, par exemple le fond des puits d'une plaque 96 puits. Les échantillons sont mis en contact avec cet anticorps et les VE exprimant ce marqueur sont alors spécifiquement fixées et capturées. Cette technique permet d'isoler la sous-population de VE que l'on souhaite étudier en fonction du marqueur protéique et de l'anticorps de capture choisis. Les protéines exprimées à la surface des VE capturées peuvent ensuite être analysées et quantifiées par le biais d'autres anticorps de détection (ciblant le même marqueur ou une autre protéine présente sur ces VE), en général couplés à une enzyme. L'ajout du substrat de l'enzyme aboutit à une réaction enzymatique

colorimétrique. La densité optique mesurée est alors proportionnelle à la quantité de protéines exprimées par les VE capturées. Cette technique permet d'identifier et de caractériser une sous-population de VE. En revanche, elle ne permet pas l'étude simultanée de plusieurs sous-populations. Seule une sous-population peut être analysée lors d'un test. Enfin, les kits commerciaux peuvent s'avérer relativement coûteux (315, 335).

Analyses multiomiques

Les approches de protéomique, de transcriptomique, de lipidomique et de métabolomique sont utilisées pour la caractérisation poussée des VE. Cette analyse macromoléculaire à haute résolution permet une étude de leur contenu global en protéines, ARNs et lipides. La détermination approfondie du contenu des VE a, en général, pour objectif la compréhension de leur fonction et/ou l'identification de biomarqueurs spécifiques, pouvant déboucher sur de potentielles perspectives d'applications thérapeutiques (336).

1.8.3.2. Les méthodes d'analyse structurale

Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission est une technique d'imagerie haute résolution, à l'échelle nanométrique, qui permet d'analyser les caractéristiques morphologiques des échantillons, notamment des VE. La microscopie est généralement complémentaire d'une autre technique. Elle apporte la confirmation visuelle que l'objet d'étude correspond effectivement à des VE. Elle fournit également une information précise sur la catégorie de VE étudiées par une mesure de leur taille. D'un point de vue technique, la microscopie électronique à transmission fait appel à un faisceau d'électron qui traverse l'échantillon. Il existe différentes méthodes de préparation des échantillons biologiques, la plus utilisée étant la coloration négative. En effet, il s'agit d'une technique simple, rapide et peu coûteuse, qui fournit cependant un ensemble d'informations morphologiques précises. Elle se base sur la création d'un contraste par dépôt de grains de colorant, comme l'acétate d'uranyle, dans les creux des structures, révélant leurs contours. En revanche, l'exploration par la coloration négative nécessite un protocole de fixation et de séchage de l'échantillon pouvant altérer la morphologie réelle des VE et donc fausser la mesure de leur taille. Afin d'éviter cette déshydratation des échantillons et de permettre une observation des VE dans leur état natif, d'autres techniques plus appropriées existent (129, 324).

La cryo-microscopie électronique à transmission (MET) d'échantillons minces est très utilisée pour déterminer l'ultrastructure des VE car elle permet de préserver leurs caractéristiques morphologiques intactes. Les VE peuvent donc être identifiées et mesurées de manière incontestable. La cryo-MET débute par une congélation de l'échantillon, permettant l'obtention d'un film ultrafin. L'échantillon vitrifié, contenant les VE, est alors imagé avec une résolution telle que les deux feuillettes de la bicouche lipidique délimitant les VE sont distinguables. Contrairement

à précédemment, cette technique ne nécessite pas de déshydratation. De plus, aucune coloration ou coupe de l'échantillon n'est requise, limitant encore davantage les artefacts provoqués par sa manipulation (11, 317).

L'immunomarquage par nanoparticules d'or consiste à cibler une protéine d'intérêt, exprimée par les VE, avec un anticorps spécifique. Des nanoparticules d'or (NpAu) permettent ensuite de révéler la liaison de l'anticorps à cette protéine. Pour cela, l'anticorps ciblant la protéine est directement couplé à la particule d'or, ou reconnu par un second anticorps lui-même couplé à la particule d'or. L'or étant très dense aux électrons, il fournit un fort contraste en apparaissant sous la forme de points noirs à l'image, révélant ainsi la présence et la localisation de la protéine ciblée au sein des VE. L'immunomarquage par nanoparticules d'or permet de pallier la fluorescence excessive observée lors du marquage par anticorps fluorescents de protéines enrichies au sein des VE. A l'inverse, cette technique assure une détection fine des marqueurs moléculaires des VE, permettant de confirmer leur nature de VE, d'identifier des sous-populations de VE et de fournir une information sur leur origine cellulaire, voire sur leurs propriétés fonctionnelles (7, 337).

Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage permet d'observer la surface d'échantillons massifs à l'échelle nanométrique. Elle fait appel à un faisceau d'électron qui balaye point par point la surface de l'échantillon. Contrairement à la microscopie électronique à transmission, le faisceau d'électron ne traverse pas l'échantillon. Elle permet de fournir des informations précises et rapides sur la morphologie et la composition chimique des éléments. La microscopie électronique à balayage est donc une méthode fiable pour confirmer la nature des VE, ainsi que déterminer la morphologie et la taille des VE (338).

Microscopie de force atomique

La microscopie de force atomique est une alternative aux techniques de microscopie électronique pour l'étude des VE. Elle permet de scanner, ligne par ligne, la surface d'un échantillon à l'aide d'une pointe souple effilée. Les résolutions latérale et verticale peuvent atteindre l'angström, fournissant une étude à l'échelle de la molécule unique. Cette technique permet donc d'analyser la topographie, les caractéristiques morpho-mécaniques et le contenu biomoléculaire des VE. Elle ne nécessite aucun marquage, ni déshydratation (143).

La grande limite de toutes ces méthodes d'analyse structurale est le faible nombre de VE analysées, ne permettant pas de faire d'étude statistique représentative.

1.8.3.3. Les méthodes d'analyse quantitative

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse multiparamétrique, quantitative et qualitative, à grande vitesse, des particules et cellules en suspension dans un liquide. L'interaction de ces éléments avec la lumière ou la fluorescence émise permet leur comptage et leur caractérisation individuelle, selon leur taille et leur granularité. Cette technique fournit donc des informations précises sur la taille, la structure et le nombre de VE au sein d'un échantillon. De plus, les marquages par fluorescence permettent d'affiner l'étude d'un type de particules au sein d'un fluide complexe. Notamment, dans le cadre de l'analyse des VE, l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des fluorophores rend possible l'analyse d'une sous-population de VE d'intérêt. Par le biais du marqueur vésiculaire ciblé, la sous-population de VE ainsi analysée est spécifiquement identifiée, quantifiée et son origine cellulaire peut être déterminée. Après perméabilisation, la détection de molécules intracellulaires est également possible. Du fait de cette caractérisation poussée, la cytométrie en flux est particulièrement bien adaptée pour des analyses d'échantillon de VE dans un cadre clinique. Cependant, la sensibilité modérée de cette méthode limite son utilisation à l'analyse des VE de « grande taille ». Les plus petites VE à ce jour détectées en cytométrie en flux ont un diamètre moyen de 100 nm, ce qui reste encore trop élevé, en particulier pour les études des exosomes (339-341).

Analyse du suivi individuel de nanoparticules

L'analyse du suivi individuel de nanoparticules est une méthode biophysique permettant de déterminer la concentration et la distribution de taille de particules, et notamment de VE, composant un échantillon. Cette technique repose sur l'observation individuelle du mouvement brownien des particules en solution au sein d'un canal micro-fluidique, c'est-à-dire, sur la relation entre la taille et la vitesse de diffusion au sein d'un fluide. Sachant que la taille d'une particule détermine sa vitesse de diffusion au sein d'un fluide, la mesure de la vitesse de diffusion des VE fournit une estimation de leur taille. En parallèle, leur comptage est réalisé. La sensibilité de cette méthode permet la détection de particules de tailles comprises entre 10 nm et 2 µm. La taille des VE étant de 30 nm à 5 µm, l'analyse du suivi individuel de nanoparticules est donc particulièrement bien adaptée pour l'étude des VE, en particulier des exosomes de petites tailles, notamment en dessous du seuil de détection d'un cytomètre. Dans la méthode d'analyse du suivi individuel de nanoparticules classique (Sc-NTA), les particules sont révélées par la lumière diffusée et aucun marquage spécifique n'est utilisé. Tous les types de particules sont alors détectés et certains complexes macromoléculaires artéfactuels peuvent fausser les données obtenues (342). Afin de pallier cette limite, une technique d'analyse du suivi individuel de nanoparticules couplée à l'utilisation de fluorophores existe désormais (FI-NTA). La détection des particules se fait alors via la fluorescence émise, renforçant la fiabilité de la méthode, et rend

possible la quantification de la taille et de la concentration d'une sous-population de VE marquées (343, 344).

Technique « tunable Resistive Pulse Sensing » (tRPS)

La technique tRPS détecte les nanoparticules individuelles par mesure du changement du courant électrique lors de leur passage à travers un nanopore. Elle est utilisée pour déterminer la taille des VE et leur concentration au sein d'un échantillon, mais aussi pour mesurer la charge de surface ou potentiel zêta des VE. Cette dernière information est particulièrement importante dans le cadre de l'utilisation des VE pour des applications thérapeutiques, notamment afin de cribler les VE produites et modifiées *in vitro* pour le traitement de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de cancers. Ce paramètre détermine en grande partie leurs propriétés pharmacocinétiques. L'avantage principal de cette technique est d'identifier avec une grande précision la taille individuelle de chaque particule dans un mélange, ce qui la rend très supérieure à la technique NTA sur ce point. Cependant, comme toutes études via des nanopores, le risque d'obstruction des pores en constitue la limite principale (345, 346).

I.9. Les intérêts thérapeutiques des VE

I.9.1. Biomarqueur

Les VE se caractérisent par une spécificité de composition, qui est le reflet du profil d'expression de la cellule sécrétrice, et traduit leur origine cellulaire. Ces VE sont alors révélatrices des caractéristiques physiologiques ou physiopathologiques de leur cellule d'origine. Dans un cadre thérapeutique, elles constituent donc des biomarqueurs pertinents pour la mise en évidence et l'identification de cellules pathologiques.

L'utilisation des VE comme biomarqueurs de pathologies se base sur la détection de ces VE dans l'organisme des patients, alors spécifiquement reconnues grâce à la présence d'un marqueur moléculaire caractéristique des cellules dont elles sont issues. Par conséquent, un marqueur moléculaire fiable doit être identifié dans un premier temps. Une analyse de la composition des VE est donc nécessaire. Désormais, l'optimisation des techniques d'analyses protéomique, génomique et transcriptomique facilite la détection de marqueurs moléculaires et augmente le potentiel d'applications thérapeutiques des VE comme biomarqueurs de pathologies (347).

L'analyse et l'utilisation des VE comme biomarqueurs nécessitent également leur extraction à partir des fluides de l'organisme du patient. Les VE sont détectables dans les fluides corporels tels que l'urine, le sang, la salive et le liquide cébrospinal. Elles peuvent donc être collectées de manière non invasive. La biopsie des liquides corporels permet d'éviter de porter atteinte à l'intégrité des organes par une biopsie des tissus, dans certains cas difficilement ou non accessibles, comme le cerveau. Les microvésicules contenant le peptide amyloïde A β 42 détectées dans le sang constituent alors un biomarqueur particulièrement précieux pour le

diagnostic et le suivi de l'évolution de la maladie d'Alzheimer (348).

Les VE, en faible concentration dans les fluides biologiques, doivent parfois être sélectivement purifiées et concentrées. Différentes approches d'extraction fiables et maîtrisées peuvent alors être employées, dont les avantages et les limites ont été présentées précédemment. L'immuno-sélection, basée sur la reconnaissance spécifique d'un antigène de surface, est particulièrement utilisée dans ce contexte. En effet, elle permet l'isolement d'une population de VE associée à un type cellulaire et optimise la spécificité des investigations (349).

Le potentiel des VE comme biomarqueurs est fortement étudié en oncologie (347, 350-352). Une analyse par spectrométrie de masse de la composition des exosomes issus de cellules cancéreuses du pancréas révèle un fort enrichissement de ces exosomes en glypican-1, un protéoglycane fortement exprimé à la surface des cellules cancéreuses. Les exosomes enrichis en glypican-1 sont extraits par cytométrie en flux à partir du sérum de patients et de modèles murins de cancer du pancréas. La détection de ces exosomes s'avère spécifique de l'état physiopathologique du donneur. Elle rend donc possible l'identification fiable des patients atteints de cancer du pancréas parmi une cohorte de donneurs sains ou malades. Le taux d'exosomes circulants enrichis en glypican-1 corrèle précisément avec le stade d'avancement de la pathologie de ces patients. De plus, ce taux d'exosomes est proportionnel à l'évolution de la charge tumorale. Il constitue donc un indicateur pertinent du potentiel de survie des patients avant et après une résection chirurgicale de la tumeur. Il permet également l'identification de stades très précoces de la pathologie. Enfin, des ARNs spécifiques de la mutation KRAS dont souffre le patient sont retrouvés au sein des exosomes enrichis en glypican-1. KRAS est un oncogène dont les mutations sont responsables de la grande majorité des cancers du pancréas. Ainsi, ces exosomes fournissent une information sur le sous-type de cancer du pancréas dont il s'agit (314).

Les VE sécrétées par les cellules cancéreuses peuvent donc être utilisées comme biomarqueurs pour le diagnostic du cancer. Leur détection assure une prise en charge précoce et adaptée du patient. Elle permet également le suivi de l'évolution de la pathologie et d'établir un pronostic fiable.

Désormais, les VE apparaissent comme des biomarqueurs pertinents pour le diagnostic et le suivi de la progression de nombreuses pathologies, telles que les pathologies neurologiques, cardiovasculaires, auto-immunes, ainsi qu'en cancérologie (296, 348, 349). Ces biomarqueurs peuvent également être utiles dans la mise en place d'approches médicales personnalisées et dans la surveillance de personnes à risque pathologique. Les VE présentent donc un intérêt biomédical majeur et peuvent également être utilisées à des fins thérapeutiques.

I.9.2. Agent thérapeutique

En tant qu'acteur majeur de la communication cellulaire, les VE assurent la circulation d'une grande diversité de molécules et leur délivrance aux cellules cibles. La capacité de chargement en cargos des VE, ainsi que leur faculté de dispersion à travers les fluides de l'organisme et les barrières cellulaires, leur confèrent un intérêt thérapeutique certain. D'autres propriétés des VE s'avèrent particulièrement favorables à leur utilisation dans un cadre thérapeutique, telles que leur biocompatibilité, leur absence de toxicité et leur faible immunogénicité. De plus, la production des VE *in vitro* est parfaitement maîtrisée et peu coûteuse. Durant cette dernière décennie, les méthodes d'exploitations thérapeutiques des VE, et de la machinerie moléculaire associée à leur biogenèse, ont connu d'importantes améliorations (349).

L'étude du potentiel thérapeutique des VE produites *in vitro* par les cellules souches démontrent que ces VE disposent de propriétés thérapeutiques endogènes. L'intérêt thérapeutique des VE dérivées des cellules souches mésenchymateuses est démontré dans le cadre de l'immuno-modulation et de la médecine régénérative (308, 353). Si ce potentiel thérapeutique apparaît évident au vu des applications cliniques associées aux cellules souches mésenchymateuses, d'autres lignées de cellules souches ou progénitrices sécrètent des VE aux propriétés similaires, apportant des améliorations significatives sur différents modèles précliniques. En effet, les VE sécrétées par les cellules épithéliales amniotiques favorisent la cicatrisation des plaies. Les cellules progénitrices endothéliales libèrent des VE limitant la fibrose pulmonaire. Les VE dérivées de cellules progénitrices endothéliales accélèrent la régénération vasculaire. Enfin, les cellules souches pluripotentes induites et les cellules progénitrices cardiaques produisent des VE ayant un effet cardioprotecteur qui favorise la récupération après infarctus du myocarde. Ces données s'avèrent particulièrement encourageantes pour l'utilisation des VE comme agents thérapeutiques dans le cadre d'un large panel de pathologies (308).

Les VE produites *in vitro* peuvent également être modifiées afin de transporter des molécules thérapeutiques. Différents types de molécules thérapeutiques peuvent être chargées au sein des VE, comme des petites molécules thérapeutiques, des protéines et des acides nucléiques. L'incorporation d'une molécule thérapeutique dans les VE permet de combiner l'effet thérapeutique de la molécule à la biocompatibilité et les facultés de dispersion des VE.

Cette incorporation artificielle de molécules nécessite la manipulation des VE ou des cellules sécrétrices. La manipulation ou ingénierie des VE correspond au chargement exogène de molécules thérapeutiques directement à l'intérieur ou à la surface des VE. L'incorporation dans les VE peut être réalisée par co-incubation avec la molécule d'intérêt, par électroporation ou par sonication. Concernant le chargement endogène, il consiste à modifier génétiquement les cellules afin qu'elles surexpriment la molécule d'intérêt et qu'elles l'incorporent au sein des exosomes lors de leur biogenèse. De plus, des méthodes d'optimisation de la production des VE

in vitro existent désormais. Les cellules productrices de VE appelées EXOtic surexpriment une combinaison de 3 gènes STEAP3-SDC4-NadB qui multiplie par 15 le taux de VE sécrétées (308).

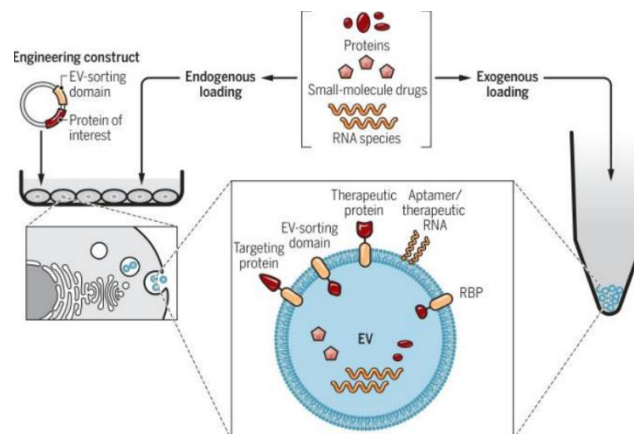


Figure 19 : Techniques d'ingénierie des VE et d'incorporation des molécules thérapeutiques (308)

La préservation des molécules et de leur potentiel thérapeutique, du fait de leur transport à l'intérieur des VE au sein de l'organisme, représente un intérêt majeur des VE comme vecteurs de molécules thérapeutiques. Dans le cas de la délivrance des ARNs en tant que molécules thérapeutiques, les VE apparaissent d'autant plus essentiels que ces acides nucléiques présentent un faible taux d'absorption par les cellules cibles et une pharmacocinétique défavorable. De plus, les ARNs sont associés à une toxicité liée à un ciblage aspécifique et à des défauts de stabilité.

Les exosomes produits *in vitro* par des fibroblastes humains peuvent être chargés avec une grande quantité d'ARNs interférents spécifiques de l'oncogène KrasG12D, une mutation caractéristique du cancer du pancréas. KRAS est l'oncogène le plus fréquemment muté et est responsable de la quasi-totalité des cancers du pancréas et de nombreux cancers de l'intestin et du poumon. Le traitement de différents modèles murins de cancers pancréatiques avec les exosomes chargés de cet ARN interférent augmente significativement la survie de ces animaux en induisant une rémission partielle ou totale de la pathologie. Les VE préservent donc efficacement les effets thérapeutiques de la molécule qu'elles transportent au sein de l'organisme (354).

Afin d'élaborer des stratégies thérapeutiques ciblées, les VE peuvent être modifiées pour induire leur tropisme. Cette technique permet de limiter la potentielle toxicité d'une délivrance généralisée de certains médicaments.

La protéine LAMP2b (lysosomal-associated membrane protein 2b) est particulièrement exprimée par les exosomes dérivés des cellules souches mésenchymateuses. L'extrémité N-terminale de LAMP2b est exposée à la surface des exosomes et peut être fusionnée à différents ligands. LAMP2b est notamment couplée à la glycoprotéine RVG (rabies virus glycoprotein), induisant un ciblage sélectif du système nerveux central, au peptide spécifique des intégrines iRGD, ciblant

les cellules du cancer du sein, ainsi qu'à l'affibody zHER de liaison au récepteur de facteur de croissance épidermique HER2 (human epidermal growth factor receptor-2) d'affinité pour les cellules tumorales (325, 355, 356).

Lorsque les VE ne sont pas naturellement porteuses de la protéine LAMP2b, les cellules qui les sécrètent peuvent être modifiées génétiquement pour surexprimer LAMP2b. La protéine surexprimée est artificiellement incorporée à la surface des exosomes et fournit un support de modification de ces VE. Les exosomes alors sécrétés par les cellules souches cardiaques, après incorporation et fusion de LAMP2b avec le peptide CMP (« cardiomyocyte specific peptide »), ciblent spécifiquement les cardiomyocytes. Ces exosomes, beaucoup plus affins pour le tissu cardiaque, ont un effet cardioprotecteur et stimulateur de la prolifération des cardiomyocytes renforcé par rapport aux exosomes non modifiés. L'ingénierie des VE permet donc une optimisation du potentiel thérapeutique de VE, qui s'avère prometteur dans le cadre de nombreuses pathologies (357).

Les VE sont également utilisées dans le cadre de thérapies anti-cancers. Elles participent à l'inhibition de la croissance tumorale, améliorent la sensibilité des cellules cancéreuses aux chimiothérapies et optimisent le ciblage spécifique des cellules cancéreuses.

Le potentiel thérapeutique de l'incorporation de la protéine TRAIL dans les VE sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses est particulièrement étudié. L'expression à la surface des VE de cette cytokine, agissant comme un ligand des récepteurs de mort cellulaire, induit spécifiquement l'apoptose des cellules de 11 lignées cellulaires cancéreuses, de manière dose-dépendante. De plus, elles provoquent la sensibilisation des cellules résistantes des cancers du poumon, du rein, du sein et du neuroblastome. Les VE apparaissent donc également comme des agents thérapeutiques potentiellement efficaces dans le cadre de thérapies anti-cancers (358).

Enfin, des applications cliniques des VE comme agents thérapeutiques montrent déjà des résultats encourageants. Des essais cliniques de phases 1 et 2 (NCT01159288) confirment la sûreté et l'efficacité du traitement avec des exosomes issus de cellules dendritiques de patients atteints de cancers tels que le mélanome, le cancer du pancréas et du colon. Ces exosomes chargés avec des antigènes tumoraux stimulent l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, alors dirigés contre les cellules cancéreuses (270). L'activation du système immunitaire du patient sous injections d'exosomes de cellules dendritiques pour lutter contre la tumeur s'apparente à une thérapie anti-cancer par vaccination avec des VE (359).

En conclusion, les VE constituent des agents thérapeutiques particulièrement prometteurs dans le cadre de nombreuses pathologies. De plus, l'optimisation des techniques d'ingénierie des VE renforce la potentialité d'une utilisation prochaine en médecine à grande échelle.

II. Le récepteur de mort Fas

II.1. Le système Fas/FasL

Le récepteur Fas, aussi appelé CD95, Apo-1 et TNFRSF6, est un récepteur de mort appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (TNFR). Cette famille de récepteurs joue un rôle clé dans différentes fonctions physiologiques et pathologiques, notamment dans le fonctionnement du système immunitaire et la lutte contre les agents pathogènes. En particulier, les récepteurs de mort, tels que le récepteur Fas, permettent d'éliminer les cellules compromises, notamment infectées ou précancéreuses, en déclenchant la mort de la cellule par apoptose. Par ailleurs, les récepteurs de mort, contrairement à ce que leur nom indique, ne sont pas uniquement impliqués dans la signalisation de mort cellulaire. En effet, leur activation est également associée à des voies de signalisation non-apoptotique n'aboutissant pas à la mort cellulaire (non-mort), mais elles aussi, impliquées dans de nombreuses fonctions physiopathologiques.

La signalisation des récepteurs de mort, et en particulier du récepteur Fas, doit donc être finement régulée pour éviter des phénomènes pathologiques. De plus, la compréhension des mécanismes contrôlant la versatilité de signalisation (mort versus non-mort) de ces récepteurs est encore actuellement un défi.

II.1.1. Découverte, structure et fonction des récepteurs de la superfamille au TNF

En 1962, W.E. O'Malley approfondit le mécanisme d'action anti-tumorale du polysaccharide bactérien *Serratia marcescens*, mis en évidence à la fin du 19^{ème} siècle. Une régression significative de la masse tumorale de sarcomes est constatée à la suite du traitement de modèles murins avec la bactérie. Le facteur identifié dans le sérum est alors désigné « tumor necrotizing factor » (360). En 1975, E.A. Carswell et al. poursuivent la caractérisation biochimique et génétique de ce facteur, identifié comme responsable de la nécrose des cellules tumorales, et le renomment « tumor necrosis factor » (TNF) (361). Enfin, les travaux de B.B. Aggarwal et al. sont à l'origine de la première purification officielle du facteur cytotoxique dérivé des macrophages, TNF- α , et du facteur cytotoxique dérivé des lymphocytes, TNF- β , en 1984. TNF- α et TNF- β ont été désignés ainsi car ils se lient au même récepteur et présentent 50% d'homologie de séquence (362).

Désormais, une large famille de cytokines et de récepteurs activés par ces ligands a été découverte sur la base d'une homologie de séquence avec le TNF- α , dont la nomenclature a été standardisée par une commission internationale en tant que superfamille du TNF (TNFSF) et superfamille des récepteurs au TNF (TNFRSF). La TNFSF compte 19 ligands et la TNFRSF comprend 29 récepteurs, suggérant que certains ligands peuvent activer plusieurs récepteurs. TNF- α et TNF- β sont les deux seuls membres ayant été identifiés au niveau protéique, avant la mise en évidence de leur séquence codante au sein du génome. Les homologies de séquence

au sein du génome humain ont permis de mettre au jour les autres membres de cette superfamille (363).

Les TNFSF et TNFRSF constituent des superfamilles de ligands et de récepteurs extrêmement conservées au cours de l'évolution, dont on retrouve une seule copie d'un couple ligand/récepteur au sein du génome des arthropodes. L'augmentation du nombre de gènes, qui corrèle avec la complexification des organismes, s'explique principalement par de multiples événements de duplication du génome entier, ainsi que par des duplications et translocations spécifiques de chaque espèce. La conservation et la complexité génétique croissante des TNFSF et TNFRSF suggèrent leur implication dans des processus fondamentaux, tels que la régulation de l'immunité adaptative, dont l'émergence, également dépendante des événements de duplication du génome, concorde avec l'augmentation des membres des TNFSF et de TNFRSF (364).

Les TNFSF et TNFRSF sont responsables de l'induction de divers mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire programmée, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires (365). Par conséquent, de nombreux processus physiologiques fondamentaux découlent de leur activation, incluant le développement, le maintien de l'homéostasie, ainsi que de multiples processus de transduction du signal, en particulier dans la régulation du système immunitaire, qui apparaît comme la fonction majeure de la TNFRSF et cruciale à l'échelle de l'organisme (365, 366). Les membres des TNFSF et TNFRSF assurent le déroulement d'une réponse immunitaire appropriée tant dans la durée que dans l'intensité. Ils contribuent grandement à la coordination des phénomènes de stimulation et d'inhibition de l'ensemble des cellules immunitaires pour le développement et l'arrêt appropriés de la réponse immunitaire, ainsi bien dans l'immunité innée que dans l'immunité adaptative (366-368).

Les voies de signalisation moléculaires initiées par l'activation de la TNFRSF doivent donc être finement régulées afin de limiter l'apparition de conditions pathologiques. Des perturbations de ces régulations impliquent les TNFSF et TNFRSF, en particulier, dans les maladies inflammatoires et auto-immunes, mais aussi, neurologiques, pulmonaires, métaboliques et dans le développement de cancers, leur expression n'étant pas limitée au système immunitaire (369). En dehors du système immunitaire, certains TNFR peuvent être exprimés par des types cellulaires d'origine tissulaire très spécifique, comme les cellules endothéliales ou neuronales, mais aussi avoir une expression plus large, voir être ubiquitaires (370, 371).

Les membres des TNFSF/TNFRSF représentent donc des cibles thérapeutiques dans le cadre de ces pathologies. En particulier, les inhibiteurs des TNFR restent à ce jour une des thérapies biologiques les plus efficaces dans le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes. En effet, l'utilisation de molécules ciblant les TNFSF/TNFRSF est désormais approuvée chez l'homme et a fait ses preuves dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la maladie de Crohn et l'ostéoporose. Par ailleurs, des agonistes de la TNFRSF, au fort potentiel anti-tumoral, sont en cours de développement (372-374).

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des fonctions associés à ces récepteurs membranaires est nécessaire pour appréhender l'intégralité de leur potentiel thérapeutique et parvenir à mettre à profit ce potentiel dans l'élaboration de nouveaux traitements, en particulier dans le cadre des pathologies pour lesquelles la TNFRSF et ses dérégulations apparaissent fondamentales, à savoir les maladies inflammatoires, auto-immunes et les cancers (366).

Tous les récepteurs appartenant à la TNFRSF se caractérisent par la structure de leur domaine extracellulaire, extrêmement conservée. Leur région extracellulaire présente des domaines riches en cystéines (**CRDs : cysteine-rich domains**), contenant 6 résidus de cystéine engagés dans la formation de trois ponts disulfures. Le nombre de CRDs dans un récepteur donné varie de 1 à 4. Notamment, le récepteur Fas présente 3 CRDs (367, 375).

Les récepteurs de la TNFRSF sont classifiés en trois catégories, en fonction de la nature de leur extrémité cytoplasmique, qui conditionne le type de protéines intracellulaires recrutées à la suite de leur activation, ainsi que la signalisation qui en découle (366).

La première catégorie correspond aux récepteurs à **domaine de mort (DD)**, aussi appelés **récepteurs de mort**. Ils se caractérisent par la présence du DD (environ 80 acides aminés) qui permet le recrutement d'adaptateurs et d'effecteurs intracellulaires, notamment les caspases, pour la transduction et l'exécution de la signalisation de mort cellulaire (376). Malgré leur appellation, ces récepteurs sont aussi associés au déclenchement de voies de signalisation de non-mort, régulant d'autres fonctions telles que l'inflammation, via l'activation de facteurs de transcription, à l'origine de modulations de l'expression génétique (377). Cette catégorie regroupe huit récepteurs de mort : Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1/TNFRSF1A), Fas (CD95/TNFRSF6), TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1/DR4/TNFRSF10A), TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2/DR5/TNFRSF10B), death receptor 3 (DR3/APO-3/TNFRSF25), DR6 (TNFRSF21), p-75-nerve growth factor receptor (p75-NGFR/TNFRSF16), ectodermal dysplasia receptor (EDAR) (378).

Le récepteur Fas fait donc partie de la catégorie des récepteurs de mort, découvert en 1989 par deux groupes de recherche indépendants grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Lors de ces études, il a été impliqué dans la régression tumorale par sa capacité à induire la mort cellulaire par apoptose (379, 380). La signalisation apoptotique déclenchée par l'activation du récepteur Fas sera décrite dans la partie « II.3. Signalisation médiée par Fas ». En 1992, les travaux de l'équipe de P.H. Krammer aboutissent à la purification du récepteur Fas (381). Son ligand FasL (Fas ligand) est, quant à lui, identifié et cloné un an plus tard (382).

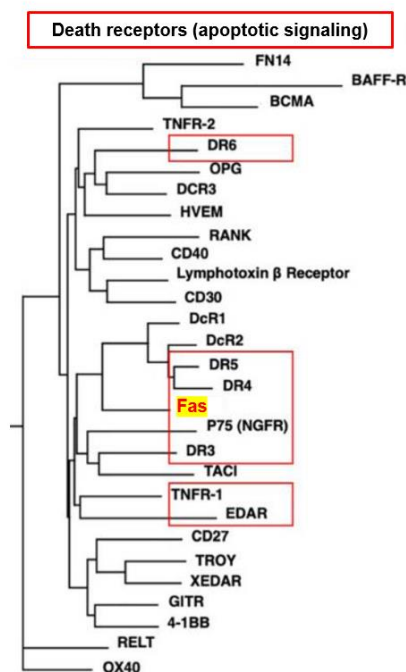


Figure 20 : Arbre phylogénétique des récepteurs au TNF avec les récepteurs de mort encadrés en rouge (378)

Les autres TNFR, qui ne possèdent pas de domaine de mort, sont appelés **récepteurs de non-mort**. Certains présentent un **motif TIM (TRAF-interacting motif)** d'interaction avec une famille de protéines adaptatrices nommées TRAF pour « TNF receptor associated factor » comprenant 7 membres. Le recrutement de TRAF initie le déclenchement de voies de non-mort, notamment via l'activation des signalisations NF- κ B, JNK et PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (383).

Enfin, d'autres récepteurs de non-mort ne présentent pas de domaine intracellulaire permettant la transduction du signal. Ils agissent, tels des leurres, en entrant en compétition avec les autres TNFR pour la fixation de leur ligand, et sont donc désignés en tant que « **decoy receptors** ». Les ligands fixés sur ces récepteurs sont neutralisés et ne peuvent pas contribuer au déclenchement des voies de signalisation. En ce sens, ces récepteurs s'apparentent à des régulateurs de la disponibilité en ligand pour l'activation des TNFR compétents (384).

II.1.2. La structure du récepteur Fas

Les analyses par microscopie électronique, cristallographie aux rayons X et spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) ont permis de révéler la structure protéique tridimensionnelle du récepteur Fas dans sa quasi-totalité. Les propriétés d'agrégation du récepteur et la flexibilité de certains de ces domaines perturbent encore l'étude structurale de quelques régions de la protéine et la résolution complète de sa structure (378).

La protéine Fas, de 319 acides aminés et de 45 kDa, est codée par un gène de 9 exons et de 8 introns, localisé au niveau du chromosome 10 (10q24.1) (385). En tant que récepteur transmembranaire, Fas présente un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique.

Le domaine extracellulaire de Fas, codé par les exons 1 à 5 et compris entre les acides aminés 1 et 156, constitue le site de fixation du ligand FasL (386). De plus, la région extracellulaire de Fas, en particulier le **domaine PLAD (pre-ligand assembly domain)**, est responsable de son oligomérisation sous forme homotrimerique, avant même la fixation du ligand. Ce processus d'homotrimerisation constitue une plateforme d'initiation de la signalisation et facilite le déclenchement de celle-ci. Le domaine PLAD de Fas se localise entre les acides aminés 1 à 66, au niveau du CRD1 de l'extrémité N-terminale de la protéine. Il est également indispensable à la fixation du ligand et à la transduction de la signalisation apoptotique (387).

La région transmembranaire du récepteur Fas, composée des acides aminés 157 à 175, est codée par l'exon 6 (386). Elle assure la stabilisation du récepteur Fas sous forme d'homotrimer au sein de la bicouche lipidique qui constitue la membrane plasmique. Par conséquent, elle participe à la formation et au maintien de la plateforme d'initiation du signal (388).

La région cytoplasmique de Fas s'étend des acides aminés 176 à 319, codée par les exons 7 à 9 du gène (386). Elle se compose d'un domaine principal, correspondant au domaine de mort (DD) de 80 acides aminés. Comme mentionné précédemment, le domaine de mort du récepteur Fas est impliqué dans l'initiation et la transduction de la signalisation apoptotique. Il permet l'interaction homotypique du récepteur Fas avec la protéine adaptatrice FADD (« Fas-associated death domain »). L'association du récepteur Fas avec cette protéine assure ensuite le recrutement des acteurs de la signalisation apoptotique, en particulier les caspases (389).

En dehors du domaine de mort, d'autres fragments du domaine cytoplasmique ont été associés à la régulation avec des partenaires moléculaires. On peut citer le domaine LRR (lysine-rich region) qui est impliqué dans la régulation et l'orientation de la signalisation associée à l'activation du récepteur Fas, en faveur de la signalisation non-apoptotique, et le domaine de liaison aux protéines à domaine PDZ de type I qui est situé à l'extrémité C-terminale de la molécule (390, 391). La séquence principale de ce « PDZ-binding domain » contient 3 acides aminés (SLV) et a initialement été identifiée pour permettre l'interaction avec la protéine à domaine PDZ FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1) (391). Ce domaine « PDZ-binding domain » est impliqué dans l'interaction du récepteur Fas avec des protéines de transduction du signal et joue un rôle fondamental dans la stabilisation du récepteur à la membrane plasmique, ainsi que dans la régulation pro-apoptotique du récepteur (392). Contrairement au récepteur Fas humain, son homologue murin ne présente pas de domaine de liaison PDZ, suggérant une acquisition de ce domaine tardivement au cours de l'évolution. Ces données apportent une nouvelle preuve de la complexification et du raffinement des mécanismes moléculaires associés aux récepteurs de mort, ainsi que de leur régulation (393).

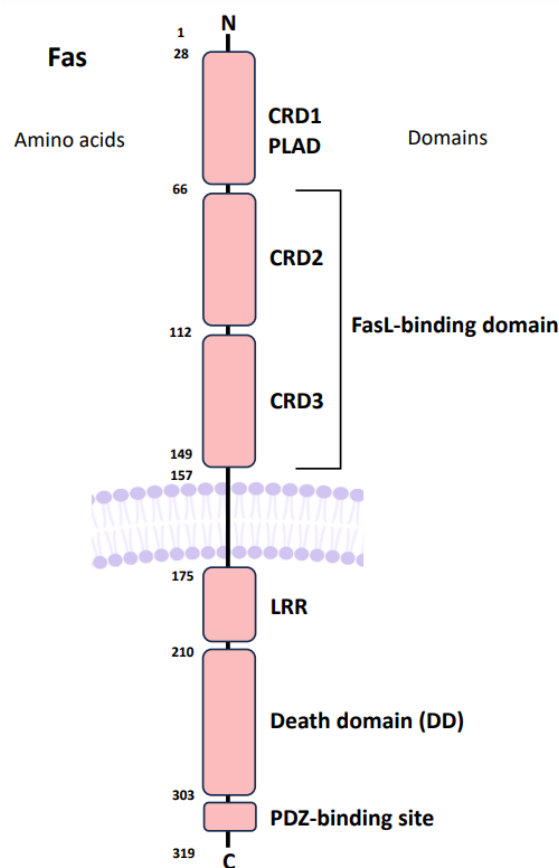


Figure 21 : Structure de la protéine Fas et ses principaux domaines

II.1.3. La structure du ligand FasL

Le ligand du récepteur Fas, FasL (TNFSF6), est constitué de 281 acides aminés (40kDa), et est codé par un gène de 4 exons, localisé au niveau du chromosome 1q23. FasL membranaire présente un long domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (394).

La région extracellulaire de FasL, comprise entre les acides aminés 102 à 281, se compose d'un site de liaison au récepteur Fas au niveau de son extrémité C-terminale, d'un domaine THD (TNF homology domain) et d'un domaine SA (self-assembly). Les domaines THD et SA confèrent à FasL des propriétés d'homotrimérisation, et par conséquent, une activité biologique par déclenchement de la signalisation (395). Au sein de la région extracellulaire de FasL, à proximité de la membrane plasmique, les métalloprotéinases disposent d'un site de clivage, générant une forme soluble du ligand. Les métalloprotéinases capables de médier ce clivage sont MMP3, MMP7, MMP9 et ADAM-10 (a disintegrin and metalloprotease-domain-containing protein-10) (396, 397).

Le domaine transmembranaire de FasL est compris entre les acides aminés 80 à 103 (378).

Enfin, la région intracellulaire de FasL s'étend des acides aminés 1 à 79 et se compose principalement d'un domaine PRD (prolin-rich domain), spécifique de sa structure, absent chez les autres membres de la TNFSF. Ce domaine agit comme un site d'ancrage pour des protéines intracellulaires et favorise la distribution de FasL au niveau de microdomaines de la membrane plasmique enrichis en lipides, appelés radeaux lipidiques (« raft »). Cette localisation préférentielle renforce sa proximité avec Fas et optimise son interaction avec le récepteur, et donc l'initiation de la signalisation apoptotique (398).

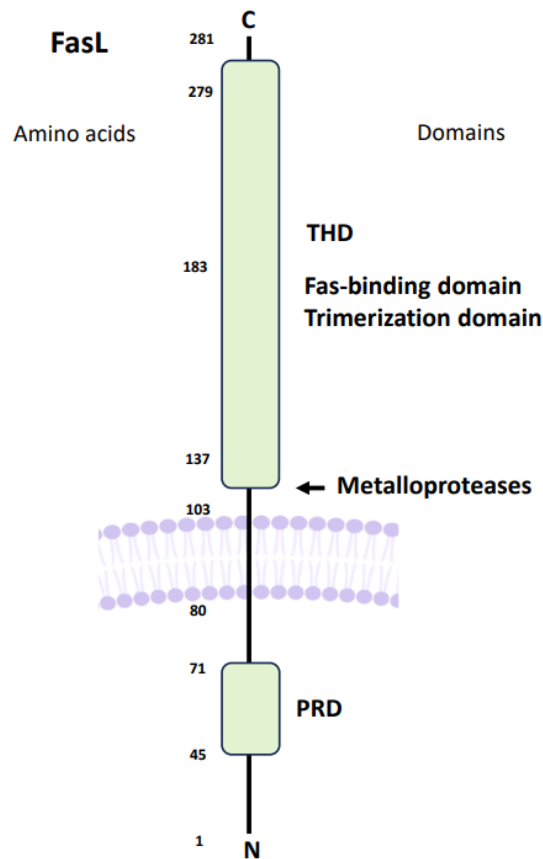


Figure 22 : Structure du ligand FasL et ses principaux domaines

II.1.4. Expression du système Fas/FasL

Si l'expression du récepteur Fas est ubiquitaire, l'expression de FasL est plus spécifique (399). FasL est exprimé par les lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK, mais également par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (400-408). Son expression peut être induite en réponse à l'activation des récepteurs des lymphocytes T, ainsi que par une stimulation via les cytokines, en particulier les interférons (IFN), à l'origine de régulations transcriptionnelles (401, 403). L'expression du récepteur Fas par les cellules immunitaires, en particulier par les lymphocytes cytotoxiques, peut également être augmentée dans le cadre d'infections virales, favorisant la maturation et l'activation des cellules immunitaires (409). L'augmentation d'expression de Fas, à la suite de l'activation des cellules immunitaires, assure également

l'élimination des lymphocytes et le déroulement d'une réponse immunitaire contrôlée (410). Ces profils d'expression confirment le rôle essentiel du système Fas/FasL, en tant que système TNFRSF/TNFSF, dans la régulation de la réponse immunitaire et l'élimination des cellules compromises cancéreuses ou infectées par un agent pathogène (411). En effet, Fas/FasL participent aux processus de stimulation et d'inhibition coordonnées de cellules immunitaires qui les expriment, orchestrant la réponse immunitaire innées et adaptatives et prévenant le développement de phénomènes inflammatoires (366-368).

FasL est également exprimé aux sites de privilège immun, tels que l'œil, les testicules, le placenta et l'utérus, ainsi qu'au niveau du système nerveux central. A nouveau, le système Fas/FasL apparait comme un régulateur de la réponse immunitaire, prévenant le développement de processus inflammatoires dans ces tissus et assurant la préservation de leur intégrité (206, 412-414).

Etant donné le rôle majeur du système Fas/FasL dans la régulation de la réponse immunitaire, des dérégulations de leur expression peuvent conduire au développement de pathologies, en particulier les maladies auto-immunes et les cancers. En effet, la présence de FasL soluble dans le sang serait associée à certaines maladies auto-immunes, ainsi qu'à des cancers comme le lymphome, le cancer des ovaires et le cancer du sein triple négatif (415-421).

Au même titre que son ligand, le récepteur Fas subit des modulations de son expression en contexte pathologique. Une diminution de l'expression du récepteur Fas est démontrée dans le cadre du développement tumoral, notamment dans les cancers du côlon, du sein, du poumon et du foie, favorisant l'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire (422-424). De plus, des perturbations de son expression, résultant notamment de mutations, sont susceptibles de provoquer des dérégulations du contrôle des processus de stimulation et d'inhibition coordonnées de cellules immunitaires médiée par le système Fas/FasL, à l'origine du développement de réactions inflammatoires et de maladies auto-immunes (425-430).

II.2. L'apoptose

II.2.1. Les généralités

II.2.1.1. Une mort cellulaire programmée

Le terme d'apoptose a été employé pour la première fois en 1972 par J.F. Kerr, A.H. Wyllie, et A.R. Currie pour décrire une nouvelle forme de mort cellulaire (431-433). La compréhension des mécanismes moléculaires de l'apoptose découle des recherches sur la mort cellulaire menées chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (434). H.R. Horvitz démontre que plus de 10% des cellules de cet organisme sont éliminées au cours de son développement par apoptose, alors définie comme une mort cellulaire programmée. Cette mort cellulaire intervient au cours d'étapes précises du développement, de manière reproductible entre nématode, suggérant une régulation fine du déclenchement de ce processus (434).

Désormais, l'apoptose est considérée comme la mort cellulaire physiologique et programmée qui prédomine au cours du développement, mais également dans une grande diversité de processus physiologiques, contribuant au maintien de l'intégrité des organismes multicellulaires, tels que le renouvellement cellulaire, le fonctionnement du système immunitaire, le développement embryonnaire et l'atrophie dépendante de signaux hormonaux (435). Par conséquent, des perturbations de l'apoptose, en excès ou en défaut, sont associées à de multiples pathologies, en particulier dans le développement de maladies auto-immunes et de nombreux cancers (301, 428). Différents groupes de recherches travaillent donc à la compréhension des mécanismes moléculaires régulateurs de l'apoptose. Une présentation des mécanismes à ce jour connus dans la régulation de la signalisation apoptotique associée à Fas sera faite dans la partie « II.4. Régulation de la signalisation du récepteur Fas ».

A l'échelle moléculaire, la signalisation apoptotique est coordonnée par l'activation caractéristique d'un groupe de protéases à cystéine, les caspases, responsables d'une cascade d'évènements depuis l'initiation de la signalisation, jusqu'à la destruction finale de la cellule (436).

II.2.1.2. L'apoptose intrinsèque et extrinsèque

L'apoptose se déroule selon deux voies de signalisation. La voie de **signalisation intrinsèque**, également appelée « voie mitochondriale », est induite par des signaux cytoplasmiques léthaux, tels que les dommages au niveau de l'ADN, la modulation positive d'oncogènes et la déprivation en facteurs de croissance. La voie de **signalisation extrinsèque**, correspondant à la voie de signalisation des récepteurs de mort cellulaire, est initiée par la fixation des ligands de ces récepteurs au niveau de leur domaine extracellulaire (268).

Le déclenchement de la voie de signalisation apoptotique intrinsèque est provoqué par l'activation des protéines de la famille Bcl-2 à BH3 (Bcl-2 homology domain (BH)3-only protein BH3-interacting domain), notamment composées de Bim, Bid et Bad. Ces protéines sont ensuite transloquées à la membrane mitochondriale où elles activent les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Une fois activées, l'oligomérisation de Bax et Bak induit la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) (437). La MOMP s'apparente au point de non-retour décisif du processus apoptotique. La cellule est alors vouée à la mort par apoptose. Seuls les neurones et certaines cellules cancéreuses sont capables d'échapper à l'apoptose à un tel stade d'avancement (438). La perméabilisation de la membrane de la mitochondrie permet le relargage de différents composants intermembranaires au sein du cytoplasme, tels que le cytochrome c, ainsi que les protéines SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) et HTRA2 (HtrA Serine Peptidase 2) (439). Le cytochrome c s'associe avec APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) et la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome. Au sein de l'apoptosome, la pro-caspase-9 est convertie en caspase-9, qui peut ensuite activer les caspases effectrices -3 et -7, à l'origine de la propagation de la cascade protéolytique affectant les composants cellulaires (440).

En parallèle, la protéase HTRA2 inhibe l'inhibiteur endogène des caspases XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) et SMAC inhibe les autres inhibiteurs des protéines apoptotiques IAP (inhibitors of apoptosis proteins) (438, 441).

L'apoptosome, comprenant la caspase-9 initiateur, ne constitue pas uniquement une plateforme d'initiation de la cascade de signalisation apoptotique. La caspase-9 semble pouvoir également intervenir en aval de l'activation des caspases effectrices -3 et -7 dans une boucle d'amplification. Dans ce contexte, la voie mitochondriale apparaît comme un mécanisme d'amplification de la signalisation apoptotique. De plus, les caspases effectrices -3 et -7 pourraient intervenir en amont de l'activation de la caspase-9 initiateur, favorisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ces données bousculent l'ordre de succession conventionnellement admis des caspases initiateurs et effectrices. La cascade de signalisation des caspases est donc un processus complexe dans lequel leur fonctionnement est complémentaire et interconnecté (442).

La voie extrinsèque est initiée par l'interaction de ligands au niveau du domaine extracellulaire des récepteurs de mort cellulaire. Ces ligands sont FasL, TRAIL et TNF. Le mécanisme moléculaire de la voie de signalisation extrinsèque sera développé dans le cadre de la partie « II.3. Signalisation médiée par Fas » (443-447).

II.2.2. La description morphologique

A l'échelle de la cellule, l'apoptose se traduit par des caractéristiques morphologiques spécifiques, en particulier par la condensation du cytoplasme, la compaction de la chromatine, la fragmentation nucléaire et le bourgeonnement de la membrane plasmique. Chacun de ces événements contribue aux processus de démolition et de démantèlement de la cellule mourante par apoptose. Ces altérations morphologiques et fonctionnelles sont, en grande partie, induites par l'action protéolytique des caspases, ciblant de multiples substrats (448, 449).

L'hydrolyse de l'ADN nucléaire est l'une des premières caractéristiques de l'apoptose. Elle est orchestrée par les caspases, responsables du clivage des inhibiteurs des endonucléases cytoplasmiques. Ces enzymes, en particulier la désoxyribonucléase CAD (caspase-activated DNase), catalysent l'hydrolyse des chaînes moléculaires de l'ADN chromosomique au niveau des sites internucléosomiaux. La fragmentation de l'ADN, en de multiples fractions d'environ 200 paires de bases, s'accompagne de la condensation de la chromatine (450).

Le début de l'apoptose est également marqué par l'arrêt des processus de transcription et de traduction. Différents facteurs de transcription sont dégradés par les caspases, notamment AP2 α , BTF3, NFATc1, NFATc2, NF κ Bp65 et SP1. Les facteurs d'initiation de la traduction eIF2 α , eIF3, eIF4B, eIF4E, eIF4G et eIF4H sont d'autres cibles des caspases, ainsi que les protéines ribosomales RPP0 et p70S6K. L'inhibition de la synthèse protéique contribue alors aux dysfonctionnements de la cellule apoptotique (451). En parallèle, la caspase-3 clive la

polymérase PARP (poly ADP-ribose polymérase), et d'autres enzymes de réparation de l'ADN, empêchant la mise en place de ces mécanismes de contrôle qualité de l'ADN. L'action des caspases contribue alors à l'irréversibilité du programme de mort cellulaire par apoptose (452).

Dans le noyau, les caspases catalysent également l'hydrolyse de protéines de la matrice nucléaire, en particulier des lamina A, B et C et de NuMA (« Nuclear Mitotic Apparatus »), contribuant à la fragmentation progressive de l'enveloppe nucléaire. Cependant, la dégradation de ces protéines n'est pas suffisante pour assurer la dissociation complète du noyau en plusieurs fragments distincts. La fragilisation de l'enveloppe nucléaire doit être combinée à des forces contractiles, exercées par le réseau d'actine, afin de provoquer la fragmentation nucléaire (453). La kinase régulatrice des forces contractiles du réseau d'actine, ROCK I, est une cible privilégiée de la caspase-3. ROCK I, alors déplétée de son extrémité C-terminale, présente une activation constitutive conduisant à l'hyperphosphorylation des chaînes légères de myosine. Le clivage de ROCK I par la caspase-3 permet donc la contraction du réseau d'actine, générant les forces nécessaires à la dissociation du noyau. Les caspases orchestrent donc l'ensemble des mécanismes à l'origine de la fragmentation nucléaire, qui correspond à un changement cytomorphologique distinctif et spécifiquement associé à l'apoptose (148).

La cellule apoptotique adhérente est également reconnaissable par sa rétractation, lui conférant une forme arrondie, observable dès les phases précoces de l'apoptose. Cette morphologie est provoquée par le clivage et la dégradation de nombreux composants du cytosquelette, médiés par les caspases ou par l'intermédiaire des protéases qu'elles activent. L'actine, ainsi que les protéines associées au réseau d'actine, telles que la myosine, la spectrine, l' α -caténine, la filamine et l' α -fodrine, sont affectées. La gelsoline constitue également une cible clé de la caspase-3 au sein du réseau d'actine. De plus, les caspases catalysent l'hydrolyse de la tubuline, de la protéine tau et du moteur moléculaire dynéine, altérant les microtubules et les protéines de transport intracellulaire associées (454).

La rétractation de la cellule contribue à sa dissociation des cellules voisines. La cellule en apoptose perd progressivement le contact avec la matrice extracellulaire. Son détachement est provoqué par la dégradation des sites d'adhérence focale qui encrent la cellule à la matrice extracellulaire, telles que FAK, p130cas et la tensine (455-457). Les caspases sont également responsables de l'hydrolyse des protéines d'adhésion inter-cellulaire, Certains composants des jonctions adhérentes, les β - et γ -caténines, ainsi que les cadhérines (458), sont des cibles des caspases. Les protéines constitutives des desmosomes sont également affectées (459). Ces processus favorisent l'isolement de la cellule apoptotique, et donc la préservation des cellules voisines.

En plus du noyau, l'apoptose est associée à la fragmentation d'autres organelles cellulaires, telles que le Golgi, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie.

La protéolyse par les caspases de la protéine GRASP65 entraîne la fragmentation du Golgi. De

plus, l'hydrolyse des protéines golgine 160, p115, p150, CDIC (cytoplasmic dynein intermediate chains), syntaxine-5 et giantine, abolissant le fonctionnement du Golgi, ainsi que les processus de maturation et de sécrétion des protéines (460-463).

Les caspases ne participent pas à la fragmentation mitochondriale. En revanche, elles contribuent aux altérations du fonctionnement mitochondrial en clivant la sous-unité p75 du complexe I de la chaîne respiratoire. Ce clivage induit le gonflement de la mitochondrie et favorise les perturbations morphologiques de cette organelle au cours de l'apoptose (464). La cellule perd alors la source d'énergie cellulaire que constitue la mitochondrie.

Les multiples fragments d'organelles présents dans le cytoplasme sont ensuite relargués dans le milieu extracellulaire, empaquetés au sein de vésicules correspondant aux corps apoptotiques. Les forces contractiles médiées par le réseau d'actine hyperphosphorylé compriment ces composants cellulaires contre la membrane plasmique. De plus, la fragilisation du cytosquelette sous-membranaire favorise le bourgeonnement dynamique de la membrane, donnant naissance aux corps apoptotiques. Ces processus aboutissent à l'expulsion dans le milieu extracellulaire de portions entières de cytoplasme associées à des fragments d'organelles. Cette étape longue et tardive de l'apoptose facilite le démantèlement et l'élimination de la cellule par les phagocytes (465).

Les caspases sont donc les acteurs majeurs des altérations morphologiques et fonctionnelles de la cellule apoptotique. A ce jour, environ 400 cibles des caspases ont été identifiées chez les mammifères (451).

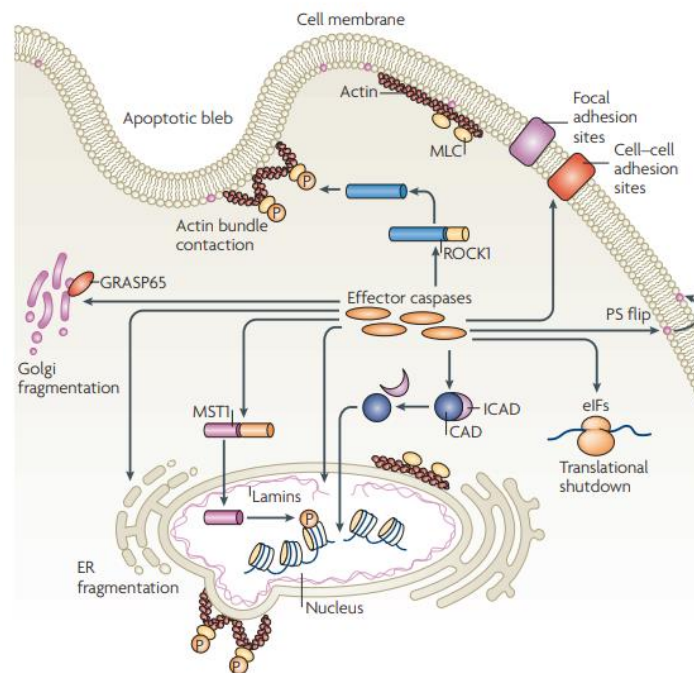


Figure 23 : Représentation schématique de l'activité protéolytique des caspases au cours de l'apoptose (148)

II.2.3. Les caspases

II.2.3.1. Les généralités

Les caspases constituent une catégorie de protéases à cystéine (cysteine aspartyl-specific proteases), exprimées sous forme de zymogènes catalytiquement inactifs, alors désignées pro-caspases. Ces pro-caspases subissent une activation protéolytique permettant de les rendre actives et d'initier des clivages protéolytiques de protéines cibles. Cette famille de protéines comprend 14 membres pouvant être impliqués dans l'apoptose (Caspases-2, 8, 9, 3, 6, 7), ainsi que dans l'inflammation (Caspases-1, 11, 12), ou assurer d'autres fonctions (Caspase-14) (268).

Une augmentation du nombre de caspases corrèle avec la complexification des organismes, suggérant un perfectionnement des mécanismes moléculaires impliquant les caspases, notamment de l'apoptose, au cours de l'évolution (269).

Lors de l'apoptose, les caspases sont activées et impliquées dans le clivage d'une multitude de protéines, et par conséquent, dans la destruction des composants cellulaires, aboutissant à des altérations irréversibles de la structure et du fonctionnement cellulaires (466). Outre leur rôle crucial dans l'apoptose, les caspases apoptotiques sont aussi impliquées dans des processus non-apoptotiques en ayant une activation sub-léthale, localisée ou de courte durée (467).

II.2.3.2. Rôle pro-apoptotique

Les caspases impliquées dans la voie apoptotique se divisent traditionnellement en deux catégories en fonction de leur ordre d'intervention au cours de la cascade de signalisation. En amont, les caspases initiatrices sont les caspases -2, -8, -9, -10, qui initient la signalisation apoptotique. En aval, les caspases effectrices -3, -6, -7, en tant qu'effecteurs cellulaires, exécutent la signalisation (268).

Les caspases initiatrices -2 et -9, également impliquées dans les processus inflammatoires, se caractérisent par la présence d'un domaine CARD (« caspase recruitment domain »), tandis que les caspases initiatrices -8 et -10, spécifiques de la signalisation apoptotique, présentent deux domaines DED (« death effector domain »). Ces domaines impliquent l'interaction des pro-caspases avec diverses protéines adaptatrices pour leur recrutement, et ainsi leur engagement dans la signalisation. De plus, l'activation des pro-caspases initiatrices par auto-clivage est favorisée par la proximité entre pro-caspases et la stœchiométrie du complexe protéique (468).

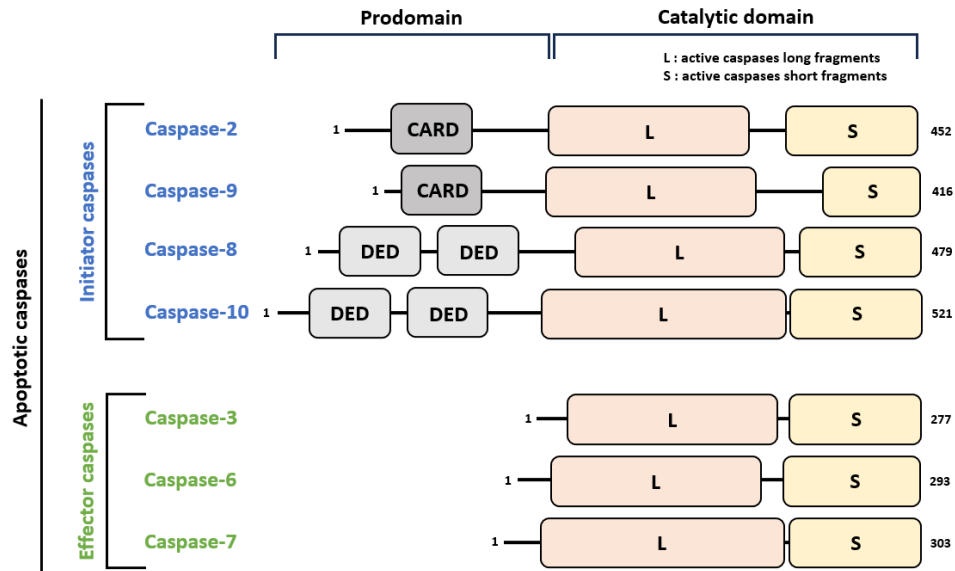


Figure 24 : Structure des caspases impliquées dans la signalisation apoptotique et leurs principaux domaines (adaptée à partir de S. Shalini et al. (469))

Les caspases effectrices -3, -6 et -7, quant à elles, se caractérisent par un pro-domaine de seulement quelques acides aminés, dépourvu de domaine CARD ou DED. En revanche, elles disposent de domaines d'activité catalytique à l'origine du clivage d'une grande diversité de substrats et sont donc responsables des manifestations phénotypiques associées à la mort cellulaire par apoptose (469, 470).

L'ensemble des substrats des caspases effectrices se caractérise par un motif commun, de 4 acides aminés, en aval duquel elles procèdent à leur clivage. Ces données suggèrent l'absence de spécificité de substrat propre à chaque caspase effectrice. En revanche, la redondance de leur activité catalytique assure l'efficacité de la phase d'exécution de l'apoptose, ne laissant aucune autre alternative que la mort cellulaire (471).

Le clivage médié par les caspases effectrices requiert un résidu aspartate en première position du site. Concernant les deux résidus suivants, un certain degré de tolérance est admis. Elles présentent ensuite une affinité particulière pour les motifs se terminant par un quatrième résidu aspartate, Asp-Xaa-Xaa-Asp, soit DXXD. Le motif DXXD a initialement été décrit dans le cadre de l'étude du clivage de la protéine nucléaire PARP par la caspase-3. Les caspases -6 et -7 présentent une très forte homologie structurale avec la caspase-3 et une affinité de clivage similaire pour les motifs DXXD (470, 472).

Le consensus majoritairement admis repose sur le fait que les premières caspases activées, par conséquent désignées comme les caspases initiatrices, activent par clivage les caspases suivantes, alors désignées comme les caspases effectrices. L'activation successive des caspases conduit à une amplification de la signalisation. Cependant, il apparaît de plus en plus évident que les caspases fonctionnent de manière complémentaire et interconnectée. Si le processus initial d'activation des caspases correspond à cette hiérarchie, une boucle de

rétrocontrôle positif de l'activation des caspases semble être médiée par des clivages réciproques entre caspases initiatrices et effectrices. En effet, il est démontré que la perte de fonction des caspases effectrices -3 et -7 induirait une inhibition presque totale de l'activation des caspases initiatrices -8 et -9, renforçant l'évidence d'une complémentarité entre caspases initiatrices et effectrices dans ce processus d'activation réciproque (442, 473).

II.3. La signalisation médiée par le récepteur Fas

II.3.1. Les voies de signalisation pro-apoptotique

L'interaction de FasL avec le domaine extracellulaire de Fas induit l'oligomérisation de Fas, initialement sous forme de trimère. Ces trimères sont préférentiellement localisés au niveau des rafts lipidiques enrichies en cavéoline (474). Dans certains cas, cette localisation semble, à elle seule, pouvoir suffire au déclenchement de la signalisation apoptotique, indépendamment de la présence de FasL (475). De manière générale, la concentration des récepteurs Fas au sein de ces domaines membranaires diminue le seuil d'induction de la signalisation apoptotique. En effet, elle favorise le regroupement en étroite proximité d'un grand nombre de domaines intracellulaires de Fas, constituant une plateforme propice à l'initiation de la signalisation apoptotique (475). De plus, l'activation efficace de la signalisation apoptotique de Fas requiert son interaction avec la forme membranaire de FasL ou l'oligomérisation de FasL soluble, préférentiellement sous forme d'hexamère, soit deux trimères adjacents (476). Cette interaction implique la région de la tyrosine en position 218 de FasL, ainsi qu'un groupe de trois chaînes latérales d'acides aminés basiques du récepteur Fas (477).

Dans son domaine cytoplasmique, Fas présente une séquence de 80 acides aminés, correspondant au domaine de mort DD. La fixation du ligand provoque un changement conformationnel du domaine de mort, exposant le site de liaison de la protéine adaptatrice cytosolique FADD (478). Le domaine DED de FADD est alors exposé et une interaction homologue avec un des deux domaines DED (DED1) des pro-caspases -8 et -10 permet leur recrutement. L'association de la pro-caspase-8 avec FADD expose son second domaine DED (DED2), qui favorise l'association d'une autre pro-caspase-8 via son domaine DED1. Ce recrutement successif conduit à l'oligomérisation de la pro-caspase-8 sous forme de dimères stables, induisant son activation catalytique par auto-clivage (479). Le complexe apoptotique constitué du récepteur Fas oligomérisé, de FADD, des pro-caspases -8 et -10 et du régulateur de la pro-caspase-8 c-FLIP est appelé le DISC (« death-inducing signaling complex ») (445, 480). Le complexe DISC est ensuite internalisé au sein du système endosomal selon un processus impliquant la clathrine et associé à un remaniement du réseau d'actine (481, 482). La caspase-8 active est ensuite relarguée dans le cytosol sous forme de tétramères composés de deux fragments p18 et de deux fragments p10. Elle peut alors activer les caspases effectrices -3 et -7 dont l'activité catalytique conduit aux clivages d'une grande diversité de substrats et à la destruction des composants cellulaires (483).

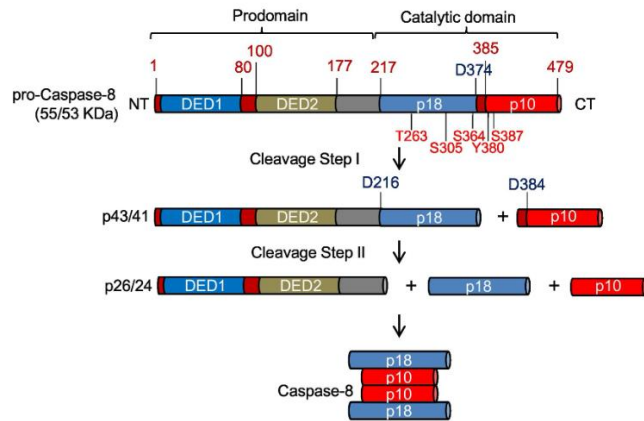


Figure 25 : Clivages et activation de la caspase-8 (484)

L'activation du récepteur Fas peut conduire à deux types de signalisations apoptotiques en fonction du type cellulaire. L'apoptose dans les cellules de type I est associée à la formation rapide et efficace du DISC et à une activation massive de la caspase-8. La cascade de signalisation se propage donc directement aux caspases effectrices. A l'inverse, dans les cellules de type II, la formation du DISC est moins efficace et la mise en place de la boucle d'amplification mitochondriale, impliquant le clivage par la caspase-8 de la molécule pro-apoptotique de la famille Bcl-2 à BH3, Bid, qui est nécessaire pour induire la perméabilisation mitochondriale, aboutissant à la formation de l'apoptosome, l'activation de la caspase-9 et *in fine* le déclenchement de l'apoptose (485, 486).

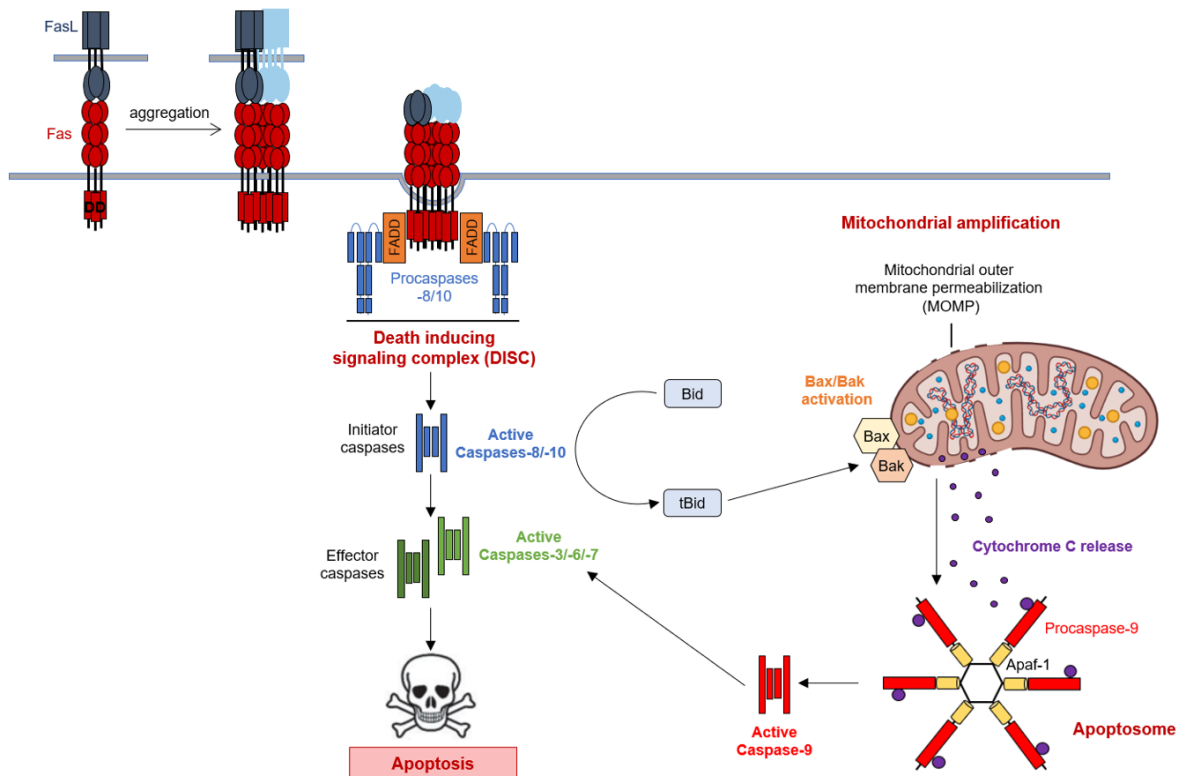


Figure 26 : Signalisation apoptotique extrinsèque induite par l'activation du récepteur de mort Fas

II.3.2. Les voies de signalisation non-apoptotique

Par ailleurs, l'activation de Fas est impliquée dans le déclenchement de voies de signalisation ne conduisant pas à l'activation de la mort cellulaire par apoptose, que l'on regroupe sous la terminologie de voies de non-mort. Le contexte physiologique et le type cellulaire sont les deux paramètres principaux qui conditionnent l'engagement de Fas dans ces voies de signalisation non-apoptotiques (487, 488).

Les voies de signalisation de non-mort associées à l'activation de Fas ont été mises en évidence dès le début des années 1990. M.R. Alderson et al. démontrent alors que l'activation du récepteur Fas augmente la prolifération des lymphocytes T et des thymocytes activés (489). D'autres études ont révélé que la stimulation de Fas provoque une induction significative de la prolifération des fibroblastes diploïdes humains (490-492). De plus, le traitement de fibroblastes par FasL induit l'activation de ERK1/2, une caractéristique moléculaire majeure de la prolifération cellulaire (493). Cependant, de manière dépendante des conditions expérimentales, à l'origine de modulations du taux d'agrégation membranaire de Fas, son activation peut être responsable du déclenchement de l'apoptose de ces fibroblastes, confirmant la dualité de signalisation associée à Fas et l'importance du contexte (491, 492).

A ce jour, un grand nombre d'études s'accordent sur le fait que l'activation du récepteur Fas est impliquée dans des fonctions de non-mort, à l'origine de réponses phénotypiques de la cellule, telles que la survie, la migration et la prolifération cellulaires, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (488). Les voies de signalisation de non-mort de Fas peuvent donc se regrouper en deux catégories principales, l'une pro-survie et l'autre pro-inflammatoire.

Même si les mécanismes moléculaires des voies de non-mort sont moins décrits que la signalisation de mort, plusieurs études réalisées durant ces dernières années apportent une vision plus claire de ces mécanismes. Néanmoins, beaucoup de ces exemples sont issus de données obtenues à partir de cellules cancéreuses où la signalisation de non-mort de Fas favorise la progression tumorale, et plus rarement dans un contexte physiologique.

Voies de signalisation pro-survie :

Le recrutement et/ou l'activation de certains acteurs moléculaires, tels que c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) et les IAP, orientent la signalisation du récepteur Fas en faveur du déclenchement des voies de signalisation pro-survie.

c-FLIP est le principal inhibiteur des caspases initiatrices -8 et -10. Cette protéine est exprimée en trois isoformes, une isoforme longue de 55 kDa (c-FLIP_L) et deux isoformes courtes de 26 et 24 kDa (c-FLIP_S et c-FLIP_R). c-FLIP possède un domaine effecteur de mort au niveau de son extrémité N-terminale, lui permettant de s'associer avec la protéine adaptatrice FADD. c-FLIP présente également un domaine protéase de type caspase. Cependant, ce domaine étant délété de certains acides aminés, la protéine c-FLIP demeure catalytiquement inactive. Une fois intégré

au sein du DISC, c-FLIP joue son rôle d'inhibiteur des caspases initiatrices par la formation d'un hétérodimère inactif avec les caspases initiatrices, favorisant ainsi le déclenchement de la voie de signalisation pro-survie par activation de la cascade de signalisation des MAP kinases et du facteur de transcription NF- κ B (494-497).

En revanche, l'inhibition de la signalisation apoptotique de Fas par c-FLIP ne semble pas être la seule issue possible. En effet, l'association de c-FLIP_L avec la pro-caspase-8 serait susceptible de conduire à la formation d'un hétérodimère partiellement actif, modifiant les substrats clivés et favorisant le déclenchement d'une voie de signalisation apoptotique alternative dépendante de l'activation de la voie de signalisation associée à l'activité kinase des protéines RIP (« receptor-interacting protein ») (498, 499). Le rôle de c-FLIP dans l'inhibition de la signalisation apoptotique et l'induction de la signalisation pro-survie associée à Fas apparaît donc complexe. La concentration initiale de c-FLIP au sein du DISC joue un rôle majeur dans la détermination de la signalisation induite par l'activation du récepteur Fas.

Par ailleurs, si la redondance fonctionnelle entre la caspase-8 et la caspase-10 au sein du DISC est reconnue dans l'induction de la signalisation apoptotique, la caspase-10 peut aussi être impliquée dans la signalisation pro-survie dépendante de Fas, associée à l'activité kinase des protéines RIP et l'activation de NF- κ B. La caspase-10 joue donc un rôle à part entière dans la régulation de la signalisation de Fas et sa dualité de fonction est désormais démontrée (500).

Le déclenchement des voies de signalisation pro-survie peut également être induit par l'intervention des molécules endogènes ciblant directement les caspases, les IAP. Huit homologues de ces protéines anti-apoptotiques ont été identifiés chez les mammifères, à savoir XIAP, hILP2, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP, NAIP, Survivin et Apollon. Elles contiennent de un à trois domaines BIR (baculovirus IAP repeat domain) et cinq d'entre elles présentent également un motif RING, leur conférant une fonction d'ubiquitine ligase E3 (501). Grâce à cette fonction de ligase E3, XIAP est considéré comme l'inhibiteur des caspases -3, -7 et -9 le plus efficace, empêchant ainsi l'amplification et l'exécution de la signalisation apoptotique. Dans ce contexte, l'activation de Fas peut conduire au déclenchement de voies de signalisation pro-survie (502).

Les IAP sont également soumis à régulation, contrebalançant leur fonction pro-survie. Parmi les antagonistes des IAP, SMAC et HTRA2 sont libérées à partir de l'espace inter-membranaire mitochondrial à la suite de la MOMP. Ces protéines inhibent les IAP par leur interaction au niveau de l'extrémité N-terminale de ces inhibiteurs. Ce processus interfère avec les mécanismes d'inhibition médiés par les IAP. La cascade de signalisation des caspases est ainsi préservée, assurant le déroulement de la signalisation apoptotique (503).

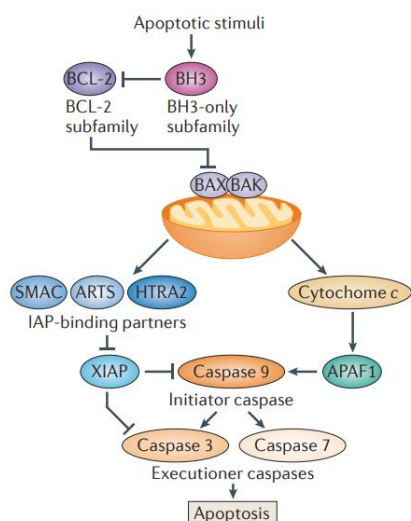


Figure 27 : Régulation de la signalisation apoptotique par les IAP et leurs antagonistes (268)

De plus, la stimulation du récepteur Fas peut induire l'activation des protéines kinases de la famille Src, incluant Yes, Fyn et Lck, responsables de la transduction de la signalisation par phosphorylation des résidus tyrosine de différentes cibles moléculaires. Cette cascade de phosphorylation aboutit à la formation du complexe d'activation PI3K (appelé PAC), incluant la kinase Yes et les sous-unités régulatrices p85 et p110 de la protéine kinase PI3K. La formation du complexe PAC et l'activation de la PI3K sont alors responsables de l'engagement des kinases Akt et mTor. Cette cascade de signalisation Yes/PI3K/Akt/mTOR provoque l'augmentation de la migration des cellules de glioblastome (504, 505).

Enfin, FasL, en particulier sa forme soluble, semble induire une activation de Fas moindre par rapport à sa forme membranaire, voire une activation de la voie pro-survie (506-508).

L'étude de P. Schneider et al. révèle que la forme soluble de FasL est produite par le clivage de FasL membranaire par les métalloprotéinases entre les acides aminés Ser126 et Leu127. Cette étude met également en évidence, par une analyse de la viabilité cellulaire, que le niveau d'activation de Fas par la forme soluble de FasL est réduit de plus de 1000 fois par rapport au niveau d'activation de Fas par la forme membranaire de FasL. Le potentiel activateur de FasL soluble est restauré *in vitro* et *in vivo* par l'addition d'anticorps de réticulation. Ces données démontrent l'importance de FasL dans la modulation fine de la signalisation de Fas et apportent une explication aux altérations tissulaires systémiques discrètes et progressives, souvent mal diagnostiquées, des patients atteints de cancers associés à des taux élevés de FasL soluble circulant (506).

D'autres études démontrent que FasL soluble pourrait induire la formation du complexe alternatif MISC (« motility-inducing signaling complex »), à l'origine du déclenchement d'une voie de signalisation pro-survie dans les cellules du cancer du sein triple négatif et de modèles murins de glioblastomes (417, 424). À la suite de la stimulation de Fas, la phospholipase Cy1 (PLC γ 1) est recrutée au niveau de domaines sous-membranaires, correspondant aux CID pour « Calcium including domain ». PLC γ 1 produit de l'inositol triphosphate (IP3) qui active les récepteurs IP3R

au niveau du réticulum endoplasmique, à l'origine du relargage des stocks de calcium, ainsi que les canaux Orai1 d'entrée de calcium à la membrane cellulaire. L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique active la protéine kinase C $\beta 2$ (PKC $\beta 2$), limitant le recrutement de FADD et de la caspase-8, et par conséquent, l'initiation de la voie de mort cellulaire (509). Cette augmentation de la concentration en calcium a également pour impact de promouvoir le déclenchement de la cascade de signalisation PI3K/Akt/mTOR, favorisant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (417, 424).

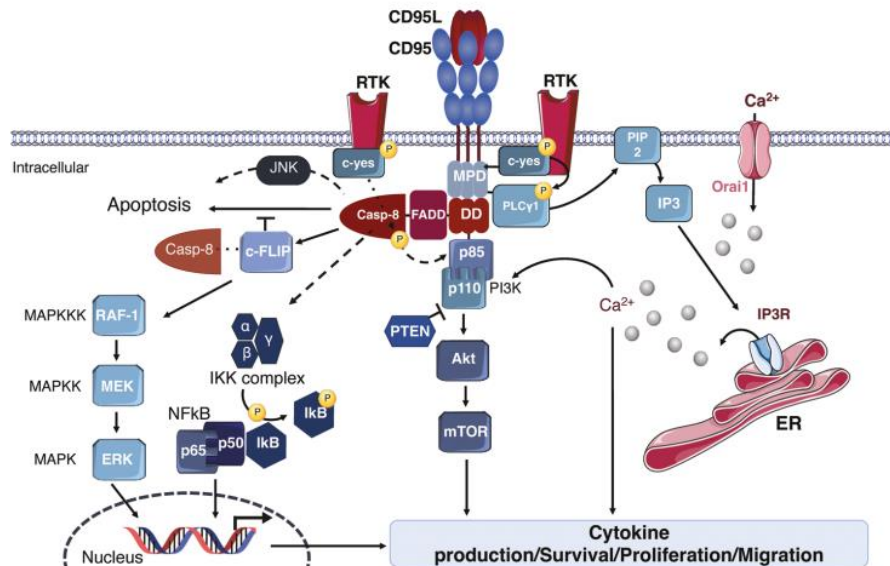


Figure 28 : Voies de signalisation non-apoptotique associées à l'activation du récepteur Fas (505)

Voies de signalisation pro-inflammatoire

Outre les voies de signalisation pro-survie, les voies de non-mort associées à l'activation du récepteur Fas comprennent aussi des voies de signalisation pro-inflammatoire (510). En effet, les membres du complexe LUBAC (« linear ubiquitin chain assembly complex »), incluant les protéines HOIP, HOIL-1 et SHARPIN, la protéine TRAF-2 (TNF receptor-associated factor 2), la protéine kinase pro-inflammatoire RIPK1 (receptor interacting serine/threonine kinase 1) et les protéines IAP1/2 constituent des acteurs du déclenchement des voies de signalisation de non-mort pro-inflammatoire dépendantes de Fas, ou d'autres récepteurs de la TNFRSF, tels que TNFR1. Le recrutement de ces molécules à la suite de l'activation membranaire de Fas a été démontré. Néanmoins, si leur rôle est précisément décrit dans le cas de la signalisation du récepteur TNFR1, les mécanismes moléculaires les impliquant dans la signalisation de Fas restent à préciser (511).

Cette cascade de signalisation pro-inflammatoire est gouvernée par un mécanisme dépendant d'une cascade d'ubiquitination. Le complexe LUBAC est responsable de l'ubiquitination de plusieurs partenaires moléculaires de la voie de signalisation de Fas, incluant RIPK1. Les motifs d'ubiquitination sur la protéine RIPK1 permettent alors le recrutement de protéines présentant

des domaines de type « ubiquitin binding domain » (UBD), dont des composants de la voie NF- κ B et de la voie des MAPK, contribuant à l'activation de ces deux voies. En effet, la poly-ubiquitinylation de RIPK1 par le complexe LUBAC permet le recrutement de la protéine kinase TAK1 (TGF β -activated kinase 1), et des complexes TAB1/2 (TAK-1-binding proteins) et IKK (I κ B kinase), respectivement à l'origine de l'activation de la voie des MAPK et de NF- κ B. L'activation de ces voies de transcription aboutit à la modulation de gènes régulant la production de cytokines pro-inflammatoires (512-514), ainsi qu'à la modulation positive de la survie, de la prolifération et de la différenciation cellulaires (514, 515). Cette réponse cellulaire induit également l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques, telles que c-FLIP (516, 517).

Ces processus sont dépendants de l'activité d'assemblage de RIPK et non de son activité kinase. Il est également à noter que l'ensemble de ces processus d'ubiquitination font intervenir d'autres E3 ubiquitine ligases, comme les protéines IAP1/2, et des déubiquitinases, telles que OTULIN et CYLD. Ces protéines ligases constituent un niveau de régulation supplémentaire, essentiel à ces mécanismes de signalisation (518-520). De même, TRAF-2, en plus d'être une protéine adaptatrice de la signalisation non-apoptotique de Fas et de TNFR1, serait susceptible de posséder une activité d'ubiquitine ligase, à l'origine de l'ubiquitination de la caspase-8, provoquant sa dégradation (521, 522).

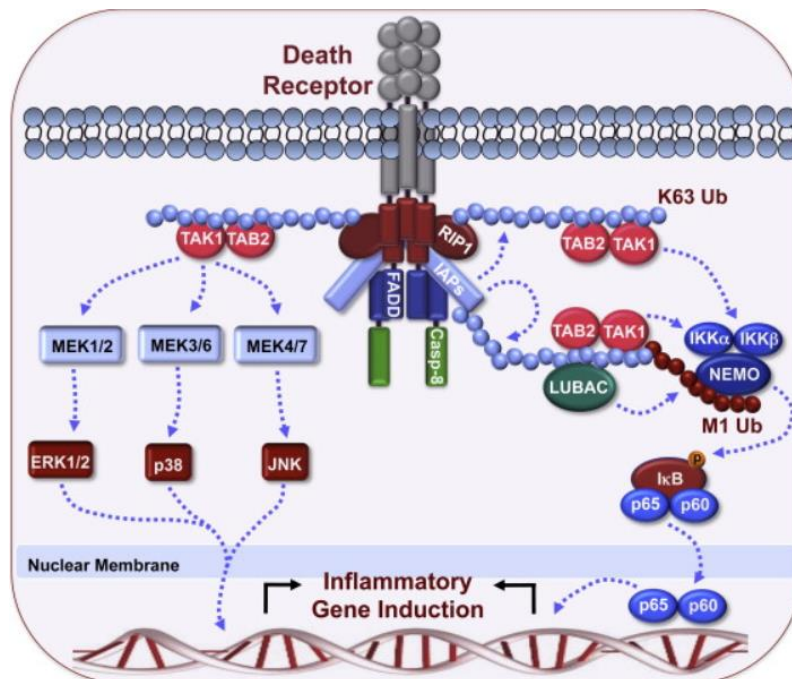


Figure 29 : L'activation des récepteurs de mort peut induire des modulations transcriptionnelles à l'origine de l'expression et de la production de cytokines pro-inflammatoires (511)

Nous concluons sur le fait que des approfondissements sont encore nécessaires concernant les mécanismes moléculaires qui déterminent l'engagement des voies de signalisation de non-mort associées à l'activation du récepteur Fas, et leur contribution dans les phénotypes cellulaires reste à déterminer.

II.4. La régulation de la signalisation du récepteur Fas

La signalisation du récepteur Fas est conditionnée par sa capacité à s'agréger à la surface cellulaire, à déclencher l'activation des caspases et donc une signalisation pro-apoptotique, ou à recruter les acteurs moléculaires favorisant la signalisation de non-mort mentionnés précédemment. La régulation de ces processus de signalisation (mort vs non-mort) et la balance entre ces deux issues, ainsi que la capacité de réponse du récepteur à la membrane, dépend de nombreux paramètres. Nous allons donc discuter de ces différents aspects de la régulation de la signalisation du récepteur Fas, en particulier du rôle de l'endocytose et du trafic intracellulaire, des corécepteurs, des modifications post-traductionnelles et de l'environnement lipidique du récepteur.

II.4.1. L'endocytose et le trafic intracellulaire

II.4.1.1. La régulation de la signalisation des récepteurs membranaires par l'endocytose

La signalisation et l'endocytose des récepteurs transmembranaires ont longtemps été perçues comme des processus distincts, avant que l'activation de ces récepteurs ait été démontrée comme un mécanisme régulateur de leur internalisation par endocytose. Ces données suggèrent alors une régulation des mécanismes moléculaires d'endocytose par la signalisation des récepteurs activés (523-525). Désormais, le concept de régulation de la signalisation des récepteurs par l'endocytose apparaît de plus en plus évident. La signalisation et l'endocytose de nombreux récepteurs sont décrites comme des processus intimement liés, tels que pour les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs à activité tyrosine kinase, comme EGFR. L'endocytose est considérée comme un mécanisme d'inhibition de la signalisation, voire de désactivation des récepteurs. Cependant, il est également admis qu'elle pourrait favoriser l'amplification de la signalisation de certains d'entre eux, notamment au cours de leur transit au sein du système endosomal (23).

Le phénomène d'endocytose peut atténuer l'intensité et la durée de la signalisation des récepteurs par une réduction de la concentration en récepteur disponible et activable à la surface cellulaire. Elle peut également induire une restriction spatiale de la signalisation. De plus, l'endocytose peut provoquer la dissociation du récepteur de son ligand ou des modulateurs membranaires, à l'origine de l'arrêt de la signalisation (23, 526-528).

A la suite de leur internalisation, les récepteurs évoluent au sein du système endosomal (précédemment décrit dans la partie « II.2.1.1. Processus d'endocytose et de trafic d'un récepteur à travers l'endolysosme »). Lors de leur transit, les récepteurs, qui n'ont pas été désactivés par le phénomène d'endocytose, peuvent être désactivés par d'autres processus, en particulier leur incorporation au sein des VIL. En effet, les récepteurs incorporés dans les VIL dans le lumen du compartiment endosomal tardif MVB semblent être efficacement isolés de leurs effecteurs

cytoplasmiques, contribuant à l'atténuation ou l'inhibition complète de leur signalisation, notamment dans le cas de certains RTK et des RCPG (526-528). Classiquement, le MVB est voué à fusionner avec le compartiment endolysosomal de dégradation. De plus, l'ubiquitylation des récepteurs et/ou de leur ligand promeut l'envoi des récepteurs endocytés vers ce compartiment, où ils terminent leur transit intracellulaire. La protéolyse des récepteurs est à nouveau un moyen d'inactivation de la signalisation (23, 114).

Si l'endocytose et le transit des récepteurs via le système endolysosomal constituent des processus d'atténuation de la signalisation, voire de désactivation complète des récepteurs, ils semblent également favoriser l'amplification de la signalisation de certains d'entre eux (23).

Recyclage des récepteurs à la membrane plasmique : Outre la voie classique de trafic intracellulaire des récepteurs, qui aboutit à leur dégradation dans le compartiment endolysosomal, les récepteurs peuvent être recyclés par retour à la membrane plasmique, et par conséquent, être à nouveau disponibles et activables à la surface cellulaire, favorisant leur activation et leur signalisation. Le devenir du récepteur entre dégradation et recyclage semble être en partie conditionné par les mécanismes moléculaires impliqués dans leur internalisation. En particulier, lorsque EGFR est internalisé via un mécanisme d'endocytose dépendant des clathrines, il semble être préférentiellement recyclé par retour à la membrane plasmique. A l'inverse, lorsque EGFR est internalisé via un mécanisme d'endocytose indépendant de la clathrine, le récepteur est majoritairement dégradé (529).

Signalisation des récepteurs au sein de l'endosome : Pour les récepteurs non recyclés, l'endosome présente de nombreuses caractéristiques uniques et offrent des conditions particulières qui semblent permettre à la membrane endosomale de servir de plateforme de signalisation propice pour la transduction de la signalisation : (1) le volume restreint de ses compartiments semble favoriser l'association ligand/récepteur et le maintien de l'activation des récepteurs ; (2) certains récepteurs, associés à un transit lent, demeurent longtemps actifs au sein de l'endosome précoce avant de rejoindre l'endosome tardif et d'être incorporés dans les VIL et dégradés ; (3) la mise à profit du réseau de microtubules pour les transports intracellulaires de potentiels effecteurs peut favoriser la proximité récepteurs/effecteurs intracellulaires ; (4) l'enrichissement de la membrane endosomale en phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) promeut l'assemblage de complexes impliquant des protéines à domaines FYVE et PX ; (5) la présence de protéines résidentes spécifiques peut être mise à profit pour l'assemblage de complexes « scaffold » ; (6) le pH acide, en particulier dans l'endosome tardif, favorise l'activité d'enzymes protéolytiques qui participent aux signalisations (23, 530).

De nombreuses études s'accordent à ce jour sur l'hypothèse selon laquelle la signalisation endosomale existe effectivement pour certains récepteurs. Il est alors proposé que les différents types de signalisation endosomale se divisent en deux catégories. La première catégorie

correspond à la signalisation non spécifique de l'endosome, qui peut aussi bien se produire à la membrane plasmique que se poursuivre dans l'endosome. La seconde catégorie regroupe les signalisations spécifiques de l'endosome, qui requièrent l'endocytose des récepteurs et/ou qui se produisent uniquement au niveau des membranes endosomales (23).

De nombreux RTK continuent de signaler au sein de l'endosome et présentent une signalisation de type non spécifique de l'endosome. Ces RTK, comme EGFR, restent associés à leur ligand à la suite de leur internalisation et semblent rester actifs dans l'endosome jusqu'à des stades tardifs de leur trafic endolysosomal, suggérant le maintien de leur signalisation, initiée à la membrane (531). Par ailleurs, la capacité des endosomes à recruter des protéines à domaine de liaison aux PtdIns3P est mise à profit pour la signalisation du récepteur TGF β . L'internalisation de ce récepteur lui permettrait alors d'interagir avec la protéine SARA (SmAD anchor for receptor activation) au niveau de l'endosome précoce, modulant positivement sa signalisation déclenchée à la membrane (532, 533).

Le recrutement spécifique de protéines à domaine FYVE est également exploité dans le cas du RCPG Ste2, mais cette fois, pour une signalisation spécifique de l'endosome (534). D'autre part, des complexes spécifiques peuvent être assemblés via le recrutement de protéines par la GTPase de l'endosome précoce Rab5. Rab5 et ses deux effecteurs homologues, API1 et API2 (adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper-containing 1/2), pourraient être impliqués dans le déclenchement d'une signalisation spécifique de l'endosome médiée par EGFR (535).

Les interactions fonctionnelles entre la signalisation cellulaire des récepteurs et les phénomènes d'endocytose sont essentielles pour la physiologie, notamment dans différentes étapes de la morphogenèse, dans la régulation de la prolifération, le métabolisme, la mobilité, la survie et la différenciation cellulaires, les réponses immunitaires et le fonctionnement du système nerveux central. En contexte pathologique, la régulation de la signalisation des récepteurs par l'endocytose peut notamment favoriser le développement de maladies neurodégénératives et de cancers. En effet, les mécanismes d'endocytose sont souvent dérégulés dans les cellules cancéreuses, perturbant les propriétés de signalisation des récepteurs (536-538).

II.4.1.2. Le cas des TNFR et de Fas

La régulation de la signalisation des récepteurs par l'endocytose et le trafic endolysosomal est un processus général, concernant également les TNFR, dont le récepteur Fas. En effet, les TNFR peuvent être inactivés par envoi à la dégradation selon les phénomènes classiques d'endocytose et d'incorporation au sein des VIL, lors de leur trafic dans le système endolysosomal (23, 539). A l'inverse, la localisation endolysosomale de ces récepteurs peut amplifier leur signalisation (482).

Endocytose et terminaison de la signalisation : Plus spécifiquement, une étude suggère la prise en charge du transport de Fas par la protéine endosomale ENTR1, provoquant l'atténuation, voire l'inhibition complète, de sa signalisation apoptotique, en diminuant le taux de récepteur Fas activable à la membrane plasmique. ENTR1 interagit avec la protéine tyrosine phosphatase FAP-1, qui elle-même est associée au récepteur Fas. En parallèle, ENTR1 interagit avec la protéine Dysbindine, associée au sous-complexe ESCRT-I de la machinerie ESCRT. Cette interaction promeut l'incorporation de Fas au sein des VIL, l'isolant de ces interacteurs intracellulaires et atténuant ainsi la signalisation apoptotique. De plus, cette incorporation dans les VIL dépendante de la machinerie ESCRT conditionne l'envoi du récepteur Fas au lysosome, responsable sa dégradation et de l'arrêt complet de la signalisation apoptotique. Lors de l'apoptose, ENTR1 est clivée par les caspases effectrices afin de moduler négativement le processus de dégradation lysosomale du récepteur Fas (143).

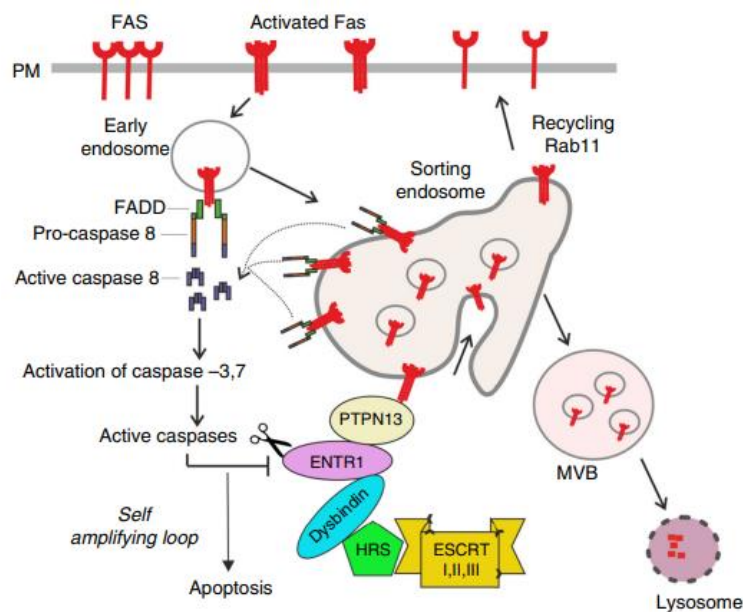


Figure 30 : Régulation de la signalisation apoptotique lors du transport endolysosomal du récepteur Fas médié par ENTR1 (143)

Endocytose et amplification de la signalisation : D'autre part, les TNFR sont susceptibles de continuer de signaler au sein de l'endosome à la suite de leur endocytose. Ce trafic semble moduler positivement la signalisation apoptotique et à l'inverse diminuer la signalisation de non-mort qui aurait lieu à la membrane plasmique.

En effet, l'endocytose semble moduler positivement la signalisation des TNFR, en particulier la signalisation apoptotique de TNFR1, déclenchée à la suite de son activation à la membrane par la fixation de son ligand. L'activation de TNFR1 conduit au recrutement des composants du complexe apoptotique DISC, notamment de la pro-caspase-8, à la membrane plasmique. S'en suit l'internalisation de TNFR1, associé au DISC, alors appelé réceptosome. La localisation endosomale de la pro-caspase-8 apparaît nécessaire pour assurer son auto-clivage, à l'origine

de son activation et semble favoriser le clivage et l'activation de la cathepsine D et de la sphingomyélinase neutre. Leur activation amplifie la signalisation apoptotique en impliquant les autres caspases, en particulier la caspases-9. Même si ces mécanismes moléculaires restent à préciser, la localisation endosomale promeut l'amplification de la signalisation apoptotique associée à TNFR1 (439).

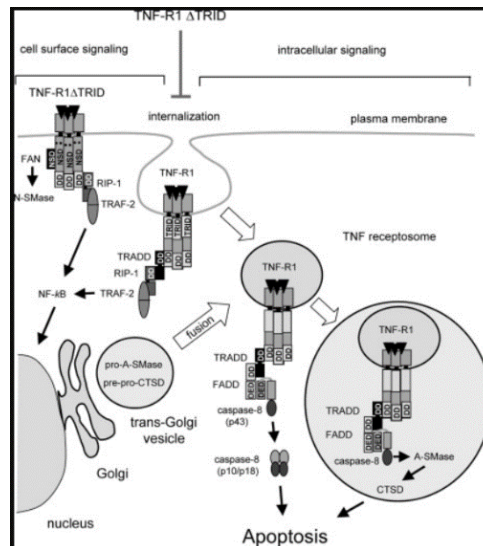


Figure 31 : Représentation schématique du mécanisme d'amplification de la signalisation TNFR1 après son incorporation dans les VIL (439)

Ces données pourraient suggérer une amplification de la signalisation apoptotique via le trafic endosomal des récepteurs de mort, ce qui pourrait également être le cas pour le récepteur Fas, comme le suggère l'étude de K.H. Lee et al. L'étude de Lee et al. fait une description du trafic endosomal de Fas, qui fait suite à son endocytose, en lien avec le recrutement de ces effecteurs intracellulaires. Le récepteur Fas est internalisé et détecté au sein du compartiment endosomal précoce dans les trois minutes suivant son activation. La protéine adaptatrice FADD, ainsi que les fragments p43/41 et p18 de la caspase-8 active sont également retrouvés au sein de l'endosome. Initialement, les niveaux d'expression de FADD et de la caspase-8 détectés au sein de ce compartiment intracellulaire sont faibles. Dix minutes après l'internalisation, ces protéines présentent un niveau d'expression maximale au niveau de l'endosome précoce, associées au réceptosome. Ces données suggèrent que la caspase-8 est préférentiellement recrutée et activée en intracellulaire, au niveau des compartiments endosomal et lysosomal. L'activation de la caspase-8 est donc majoritairement endolysosomale, au regard de son recrutement et de son activation initiale à la membrane plasmique, lors de la formation du DISC. L'optimisation du recrutement intracellulaire de FADD et de la caspase-8 active suppose que le transport endosomal de Fas expose son domaine intracellulaire aux interactions et favorise sa proximité avec ses effecteurs intracellulaires. Par conséquent, le trafic endosomal de Fas semble favoriser l'amplification de la signalisation apoptotique (482).

L'importance de l'internalisation du DISC pour le recrutement et l'activation efficace de la

caspase-8 au sein du compartiment endosomal mise en évidence dans cette étude fait écho aux données préalablement établies dès les années 1990. L'étude de D.A. Martin et al. démontre alors que la caspase-8 activée et arrimée à la membrane plasmique ne permet pas d'induire la mort cellulaire, suggérant la nécessité d'une internalisation et d'une phase d'activation intracellulaire (540).

De plus, l'étude de K.H. Lee et al. confirme que l'inhibition de l'endocytose du récepteur Fas empêche la mort cellulaire par apoptose. Elle propose alors un mécanisme régulateur de la signalisation de Fas selon lequel la localisation membranaire de Fas est préférentiellement associée à sa signalisation non-apoptotique, tandis que sa signalisation apoptotique nécessite son internalisation (482).

La voie d'endocytose dans le contrôle de la signalisation : L'endocytose du récepteur Fas serait médiée par un processus dépendant de la clathrine et du réseau d'actine, et a lieu préférentiellement au niveau des rafts lipidiques (541). Une autre étude menée par notre équipe démontre que l'endocytose du récepteur Fas est régulée par un motif extracellulaire particulier de liaison aux glycosphingolipides (« glycosphingolipid-binding motif »). Ce motif est indispensable à l'endocytose dépendante de la clathrine et des rafts lipidiques, facilitant le déclenchement de la signalisation apoptotique (542). De manière intéressante, l'absence d'endocytose par la clathrine et les rafts lipidiques favoriserait une voie d'endocytose alternative favorisant une signalisation de non-mort, suggérant que comme pour d'autres récepteurs (paragraphe précédent « 2.4.1.1. La régulation de la signalisation des récepteurs membranaires par endocytose »), la voie d'endocytose influencerait la signalisation du récepteur.

Le laboratoire a identifié un autre motif au niveau de l'extrémité intracellulaire de Fas, une région enrichie en lysine (LRR), responsable de sa localisation préférentielle au sein de nano-domaines membranaires enrichis en sphingolipides et cholestérol, formant les rafts lipidiques. Le motif LRR s'avère nécessaire à l'interaction du récepteur Fas avec le cytosquelette d'actine, conditionne son mode d'internalisation et oriente sa signalisation. En effet, la localisation constitutive du récepteur Fas dans les rafts lipidiques joue un rôle fondamental dans le recrutement du DISC et l'induction de la signalisation apoptotique (390). Par conséquent, l'internalisation du récepteur Fas au niveau des rafts lipidiques apparaît indispensable à la formation du DISC et au déclenchement de la signalisation apoptotique (467, 482, 493).

En conclusion, la régulation de l'endocytose et du trafic endosomal de Fas conditionne fortement sa signalisation apoptotique versus non-apoptotique. Les différents processus régulant l'endocytose du récepteur, ainsi que son devenir au sein de l'endosome, restent à comprendre dans leur intégralité. Cependant, leur compréhension s'avère essentielle afin de mieux appréhender la versatilité du récepteur Fas et des autres récepteurs de la TNFRSF.

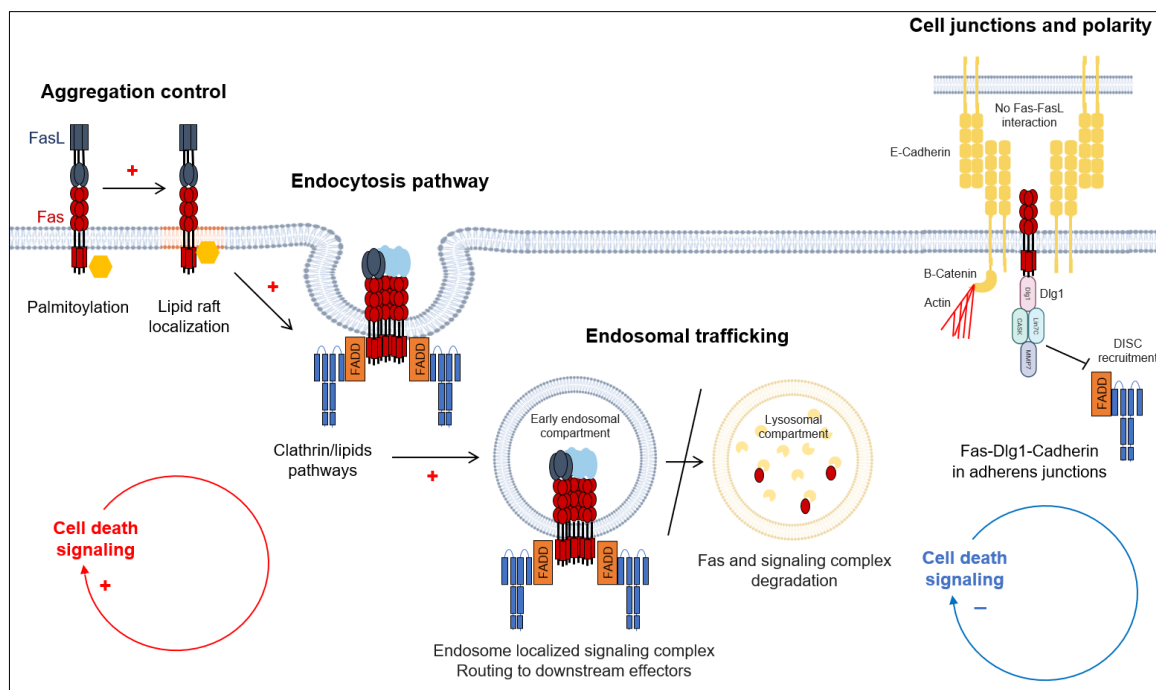


Figure 32 : La localisation membranaire et le transport intracellulaire de Fas régulent la signalisation apoptotique de Fas

II.4.2. Les co-récepteurs

Les récepteurs membranaires sont susceptibles de s'associer avec d'autres récepteurs présents à la surface cellulaire, qui peuvent moduler leur signalisation : ce sont des corécepteurs. Plusieurs corécepteurs de Fas ont été identifiés, pouvant moduler la signalisation de Fas en bloquant sa signalisation et/ou en favorisant sa signalisation non-apoptotique. A nouveau, l'association de Fas avec un co-récepteur peut être à l'origine de sa versatilité. Nous évoquerons un exemple de régulation de la signalisation apoptotique de Fas médiée par deux corécepteurs : la E-cadhérine et le récepteur EGFR.

La présence de Fas à la surface cellulaire, notamment au sein des épithéliums, implique que son activation et sa signalisation soient finement régulées afin d'éviter l'élimination incontrôlée des cellules épithéliales qui l'expriment. Les complexes d'adhérence cellule-cellule, qui participent à la régulation de nombreux récepteurs (543-546), pourraient être impliqués dans la régulation de Fas. Parmi ces complexes, les jonctions adhérentes (JA) sont essentielles au maintien de l'homéostasie épithéliale et l'absence de certains de ces constituants, en particulier la E-cadhérine, conduit à une désorganisation tissulaire, notamment associée à une sur-prolifération des cellules épithéliales et à une perte de polarité apico-basale (547, 548). La perte des JA provoque également une augmentation de la mort cellulaire, suggérant que les JA induisent des signaux de survie cellulaire (549-551). De plus, la perte d'expression du complexe apico-basal Scrib-Dlg1-Hugl1 est responsable de l'apoptose (552-554). Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme de « sécurité » favorisant l'élimination des cellules épithéliales sans polarité ou sans contact avec les cellules voisines.

Dans ce contexte, le laboratoire propose un mécanisme de régulation de la signalisation de Fas selon lequel la localisation de Fas au niveau des JA, en particulier sa proximité avec E-cadhérine et α -caténine, empêche la fixation optimale de FasL et l'activation de la signalisation apoptotique. L'accumulation de Fas aux JA requiert le domaine de liaison aux protéines à domaine PDZ. Ce domaine interagit préférentiellement avec la molécule de polarité Dlg1. Cette interaction conduit à une inhibition des signaux de mort médiés par Fas, suggérant que Dlg1 interfère avec la formation et la stabilisation du DISC. Par conséquent, les signaux pro-apoptotiques de Fas sont inhibés par deux mécanismes complémentaires qui dépendent de la formation des JA et de l'établissement de la polarité apico-basale impliquant Scrib (392).

Ce mécanisme de régulation de la mort cellulaire est crucial pour protéger les cellules saines de l'apoptose, ainsi que pour détecter et éliminer les cellules « anormales » des tissus épithéliaux, notamment en contexte pathologique tel que le cancer (555).

Ce mécanisme de « sécurité » semble être conservé au cours de l'évolution car les données du laboratoire présentent des similitudes frappantes avec celles obtenues chez la drosophile. En effet, le récepteur au TNF de la drosophile Gnr α , qui est activé par son ligand Eiger, induit l'élimination par apoptose des cellules épithéliales non-polarisées, en contexte de perte de fonctions de Scrib et Dlg1 (ARNs interférents). De plus, Gnr α s'avère associé avec le complexe de polarité Crumbs et Veli (lin7), qui régulent sa signalisation. A nouveau, ces données font écho à celles du laboratoire, démontrant que Lin7c, l'homologue de Veli chez les mammifères, interagit avec Fas de manière dépendante de Dlg1. Le contrôle de la signalisation des TNFR par les molécules de polarité apparaît donc comme un mécanisme conservé au cours de l'évolution (556, 557).

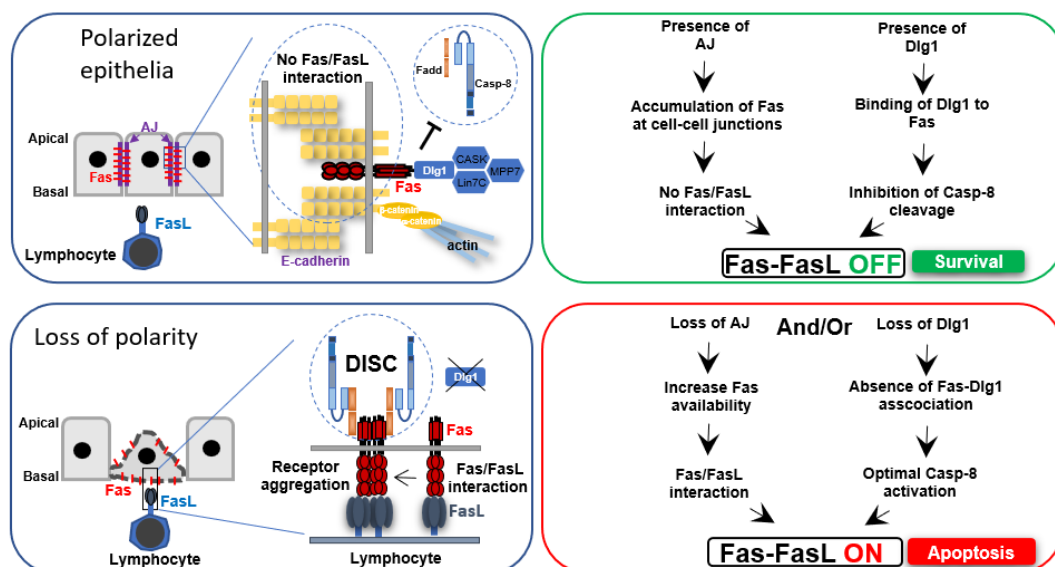


Figure 33 : Modèle schématique récapitulatif de la fonction inhibitrice du complexe Fas-cadherine-Dlg1 sur la signalisation apoptotique (392)

A l'inverse de la E-Cadherine, l'étude de R. Reinehr et al. démontre que le récepteur EGFR semble être lié à la modulation de la signalisation du récepteur Fas en tant que co-récepteur positif. L'activation de EGFR au sein des hépatocytes conduit à la phosphorylation de Fas au niveau de résidus tyrosine, favorisant le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose (558).

Cependant, d'autres groupes de recherche ont démontré que l'activation de EGFR interfère avec la signalisation apoptotique de Fas et peut induire le déclenchement de la voie de signalisation de non-mort des MAPK, notamment au sein des hépatocytes, nuanciant les données précédentes (559). De plus, notre équipe a démontré que Fas, phosphorylé au niveau de la tyrosine Y291, interagit avec EGFR et intensifie sa signalisation au sein des cellules de cancer colorectal via la voie de signalisation des MAPK. Sous traitement avec EGF, Fas s'accumule au niveau nucléaire et promeut la localisation nucléaire de EGFR et de STAT3, l'expression de la cycline D1, ainsi que l'activation de la voie des MAPK et de Akt médiée par STAT3, provoquant la prolifération et la migration cellulaires (560). L'activation de EGFR serait également responsable de l'inhibition de la signalisation apoptotique de Fas dans les cellules de gliome (561). Il s'avère donc difficile de se prononcer sur l'effet de EGFR en tant que co-récepteur dans la modulation de la signalisation apoptotique de Fas.

Concernant les co-récepteurs, les mécanismes de régulation négative de la signalisation apoptotique de Fas semblent à ce jour être mieux décrits que les mécanismes de régulation positive.

II.4.3. Les modifications post-traductionnelles

Des modifications post-traductionnelles du récepteur Fas modulent sa distribution membranaire, et par conséquent, régulent sa signalisation. En effet, le récepteur Fas est susceptible de subir une palmitoylation, des glutathionylations, des phosphorylations, des nitrosylations et des glycosylations (562).

II.4.3.1. La palmitoylation

La fixation de FasL au niveau du site d'activation du récepteur Fas induit son oligomérisation et sa redistribution au niveau de microdomaines membranaires enrichis en lipides. Cette localisation particulière et l'agrégation membranaire du récepteur sont deux événements indispensables au déclenchement de sa signalisation pro-apoptotique.

Notre équipe, ainsi que d'autres groupes de recherche, ont montré que la palmitoylation de Fas fait partie des mécanismes moléculaires régulateurs de ces processus précoces d'agrégation liés à la signalisation apoptotique (541, 563-567). L'ajout d'un acide palmitique, correspondant à un acide gras composé d'une chaîne de 16 atomes de carbone, se fait sur le résidu cystéine 199 situé dans domaine intracellulaire jouxtant le domaine transmembranaire de Fas. Cette palmitoylation facilite l'agrégation membranaire du récepteur Fas au sein des rafts lipidiques

riches en cholestérol et sphingolipides (541, 563-567). Ces agrégats, résistants aux détergents et de très haut poids moléculaire (220 kDa), constituent les sites d'activation de la caspase-8. Des mutations du résidu cystéine en position 199, empêchant la palmitoylation du récepteur Fas, abolissent l'agrégation et l'internalisation de Fas, ainsi que le recrutement et l'activation de la caspase-8. La palmitoylation de Fas apparaît donc comme une modification post-traductionnelle essentielle dans l'initiation de la signalisation apoptotique (568). Une analyse réalisée par le laboratoire a permis d'identifier l'enzyme potentiellement à l'origine de la palmitoylation du récepteur Fas comme étant DHHC7, de la famille des palmitoyl acétyltransférases DHHC (569).

Parmi les récepteurs de mort, d'autres récepteurs sont palmitoylés, notamment DR4. Une autre étude menée par le laboratoire démontre que la palmitoylation de DR4 est essentielle à sa localisation au niveau des rafts lipidiques et à son oligomérisation, deux étapes cruciales de l'initiation de la signalisation de mort cellulaire médiée par DR4. Cependant, cette même étude n'a pas mis en évidence de palmitoylation des récepteurs DR5 et TNFR1, suggérant que la palmitoylation n'est pas un processus général aux récepteurs de mort (570).

II.4.3.2. La phosphorylation du domaine cytoplasmique

L'orientation de la signalisation associée à l'activation du récepteur Fas est fortement conditionnée par sa phosphorylation. En particulier, la phosphorylation des tyrosines en position 232 et 291 au sein du domaine de mort de Fas inhibe la signalisation apoptotique et favorise la signalisation non-apoptotique de survie cellulaire. La phosphorylation de ces résidus tyrosines est régulée par la famille des kinases Src et la phosphatase SHP-1. L'inhibition de la signalisation pro-apoptotique du récepteur Fas par une augmentation significative des taux de phosphorylation des résidus Y232 et/ou Y291 a été observée dans différents types de cancers, tels que le cancer du côlon, du sein et des ovaires. La régulation de ces phosphorylations joue alors un rôle dans la promotion de la prolifération tumorale (423).

II.4.3.3. Les autres modifications post-traductionnelles

La S-glutathionylation correspond à la création d'un pont disulfure réversible entre la cystéine du glutathion et le résidu cystéine d'une protéine. Le glutathion est un antioxydant qui participe à la protection des cellules des radicaux libres et autres molécules réactives à l'oxygène (ROS). La glutathionylation du récepteur Fas pourrait intervenir à la suite de l'activation des caspases-8 et -3. D'après cette étude, la fixation de FasL induit le recrutement et l'activation d'une fraction de caspase-8 (moins de 1%). Cette infime fraction de caspases activées est responsable du clivage et de l'inhibition de l'enzyme GRX1 (thiol transférases glutaredoxin 1). L'inactivation de cette enzyme favorise l'accumulation de Fas avec glutathionylation et sa redistribution préférentielle au niveau des rafts lipidiques. L'agrégation de Fas permet ensuite la formation du DISC, ainsi que le recrutement et l'activation massive de la caspase-8. Ce processus pourrait donc contribuer à la sensibilisation de la cellule à la signalisation apoptotique (571).

La S-nitrosylation, c'est-à-dire la liaison covalente d'un groupe oxyde nitrique à un thiol de résidu cystéine, se produit au niveau des résidus cystéine en position 199 et 304 au niveau de l'extrémité intracellulaire de Fas. Cette modification semble augmenter l'expression membranaire de Fas, et par conséquent, favoriser la sensibilisation des cellules à la signalisation apoptotique. La S-nitrosylation a également pour impact la concentration de Fas au niveau des microdomaines membranaires enrichis en lipides. Elle favorise ainsi la formation du DISC et la transduction de la signalisation apoptotique au sein de lignées cellulaires de cancers du sein et du colon (572).

Enfin, la N-glycosylation du récepteur Fas, en positions N118 et N136, semble jouer un rôle dans la régulation de la signalisation apoptotique. En effet, un modèle d'étude *in silico* des modifications post-traductionnelles de Fas démontre que sa N-déglycosylation pourrait être responsable d'une réduction de l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC, limitant le déclenchement de la signalisation apoptotique (573).

La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des modifications post-traductionnelles de Fas pourrait permettre de mieux appréhender les processus mis en place par les cellules cancéreuses résistantes à l'induction de la signalisation apoptotique extrinsèque (562).

II.4.4. L'environnement lipidique

En tant que composants majeurs de la membrane plasmique, les **sphingolipides** contribuent à la formation des microdomaines membranaires enrichis en lipides, les rafts lipidiques. Du fait de cette localisation membranaire particulière, les sphingolipides jouent un rôle essentiel dans la régulation de la phase d'initiation de l'apoptose, lors du processus d'agrégation et de redistribution du récepteur Fas au niveau des rafts lipidiques (574).

Les sphingolipides sont des lipides complexes, dérivés de la sphingosine. Différents substituants peuvent être ajoutés au niveau de la fonction alcool primaire de la sphingosine. En fonction de la nature de ce substituant, différents métabolites sont générés, notamment la céramide et la S1P. La céramide est produite par la céramide synthase à partir de la sphingosine. De plus, l'action d'une autre enzyme, la sphingomyélinase, fournit de la céramide à partir de la sphingomyéline. Quant à la production de S1P, elle est médiée par la sphingosine kinase, responsable de la phosphorylation de la sphingosine. La production de céramide et de S1P à partir de la même molécule, la sphingosine, suppose l'existence d'un équilibre entre les productions de ces deux métabolites, qui s'avèrent avoir des fonctions contradictoires dans la régulation de la signalisation apoptotique (575).

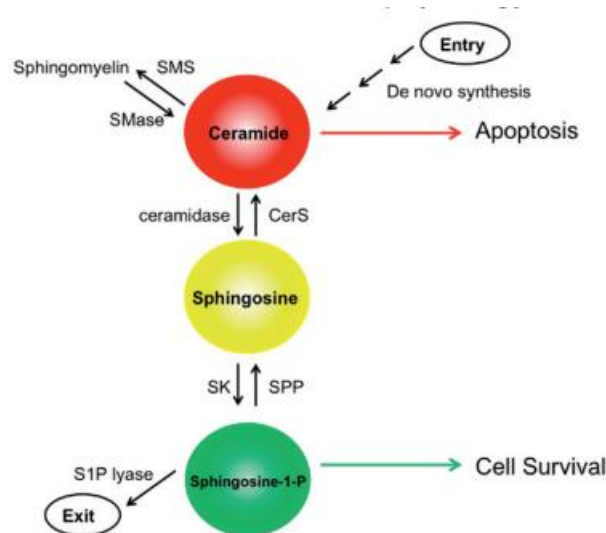


Figure 34 : Métabolisme et homéostasie des sphingolipides (575)

Certaines études démontrent que l'agrégation de Fas pourrait être dépendante de la régulation de la sphingomyélinase acide (ASM). Cette enzyme lysosomale, responsable de la production de céramide (576) serait transloquée à la membrane plasmique en conséquence de sa phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) sur la Ser 508 (577). L'ASM est ensuite transférée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique de la cellule où elle hydrolyse la sphingomyéline en céramide. La concentration de céramide augmente rapidement au niveau des rafts lipidiques à la suite de la fixation de FasL et favorise l'agrégation du récepteur, participant ainsi à la formation de la plateforme d'initiation de la signalisation apoptotique (578). L'activation et la translocation de l'ASM impliqueraient également l'activation précoce de caspase-8. En effet, l'inhibition de l'activation de la caspase-8 bloque la translocation de l'ASM à la membrane plasmique (576). L'agrégation du récepteur Fas, modulée positivement par l'augmentation de la concentration en céramide, a pour conséquence l'amplification du recrutement et de l'activation de la caspase-8. L'activation de la caspase-8 est alors suffisante à la transduction de la signalisation apoptotique (579). L'activation de l'ASM pourrait également avoir lieu au sein de l'endosome à la suite d'une activation protéolytique médiée par la caspase-7, lui permettant ainsi de participer au processus d'amplification de la signalisation apoptotique qui se produit au sein de ce compartiment intracellulaire (576, 580).

La céramide est aussi synthétisée au niveau de l'enveloppe nucléaire et de sites intra-nucléaires. En effet, l'activation du récepteur Fas induit l'augmentation du taux de céramide nucléaire à la suite de l'activation de la sphingomyélinase neutre nucléaire dans de nombreux modèles cellulaires. Cet événement s'avère dépendant des caspases effectrices (581). La céramide nucléaire serait susceptible de former des pores nucléaires et d'altérer la distribution de l'importine- α et de RanGTP, impactant ainsi le transport nucléo-cytoplasmique (582).

L'activation de l'ASM au niveau du lysosome conduit à l'accumulation de céramide au sein de ce compartiment. En effet, la sphingosine est capable de pénétrer au sein du lysosome et permet la

synthèse de céramide lysosomale. Cette accumulation serait susceptible d'induire la rupture partielle de la membrane lysosomale (583). La protéase lysosomale, cathepsine D, est alors libérée par diffusion à travers la membrane lysosomale et peut contribuer à la signalisation apoptotique. Elle est responsable du clivage de la protéine pro-apoptotique Bid, favorisant le relargage du cytochrome c et la voie apoptotique mitochondriale (580, 584).

La production de céramide dépendante de la sphingomyélinase est initiée à la suite de l'activation de Fas et est donc à l'origine d'un ensemble de mécanismes moléculaires facilitateurs de la signalisation apoptotique.

Comme mentionné précédemment, il existe un équilibre entre le taux de céramide et de S1P. Ces métabolites sont caractérisés par des effets opposés sur la signalisation apoptotique. Tandis que la céramide est associée à une fonction pro-apoptotique, la S1P est associée à une fonction pro-survie, permettant aux cellules d'échapper à la mort cellulaire par apoptose (585).

La S1P inhibe l'apoptose au niveau intracellulaire via l'activation/inhibition réciproque des signalisations ERK1/2 et JNK/p38 respectivement. La voie de signalisation ERK1/2 activée par la production de S1P inhibe la protéine pro-apoptotique Bcl-2 BAD, limitant ainsi la libération du cytochrome c et le déclenchement de la voie mitochondriale d'amplification apoptotique (586). En parallèle, la signalisation ERK1/2 promeut la prolifération cellulaire (587). A l'inverse, la production de S1P inhibe la signalisation JNK/p38, favorisant également la survie cellulaire (585). Ces données démontrent le rôle essentiel de la S1P dans la régulation des voies de signalisation dépendantes des MAPK, à savoir la stimulation de la voie de signalisation anti-apoptotique MAP kinase/ERK et l'inhibition de la voie de signalisation pro-apoptotique MAPK/JNK.

Un mécanisme extracellulaire d'action de la S1P inhibe également l'apoptose et favorise la survie cellulaire. La S1P peut être transloquée en extracellulaire afin d'activer les récepteurs à S1P (S1PR1, 2 et 3). La fixation de la S1P au niveau des récepteurs S1PR est couplée à l'activation de la protéine G α i. Cette protéine transduit l'activation de la signalisation pro-survie associée à ERK au sein des cellules épithéliales. L'activation des S1PR est également associée à l'induction de c-Jun et de c-Fos (588, 589). De plus, l'action de la S1P à la membrane conduit à une diminution du taux de protéine pro-apoptotique Bax, ainsi qu'à l'inhibition de la caspase-3 (590).

Outre les sphingolipides et leurs métabolites, les **phosphoinositides** constituent une autre famille de lipides qui contribue aux modulations de la signalisation pro-apoptotique de Fas. Les phosphoinositides sont constitués d'un noyau inositol sur lequel est fixé un squelette glycérol par liaison phosphodiester. Sur ce squelette glycérol, sont fixés les acides gras, comprenant majoritairement l'acide stéarique et l'acide arachidonique. Le métabolisme des phosphoinositides est particulièrement actif grâce à l'action d'un ensemble de kinases PIK et de phosphatases spécifiques (591, 592).

Une étude menée par le laboratoire révèle l'interaction de la tyrosine kinase Btk avec le récepteur Fas d'une part, et avec la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K1 γ) d'autre part. L'activation du récepteur Fas provoque la stimulation de la kinase PIP5K1 γ , alors responsable d'une production rapide et transitoire de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂). L'activation de la tyrosine kinase Btk est également requise dans cette production. La coopération des kinases PIP5K1 γ et Btk dans la synthèse de PI(4,5)P₂ conduit à la modulation négative de la signalisation pro-apoptotique de Fas, suite à son activation, au sein de lignées cellulaires colorectales (593).

Par ailleurs, la PI3K induit des signaux anti-apoptotiques. Un des produits de la PI3K, le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, active la phosphatidylinositol-dépendent kinase (PKD). Combiné au phosphatidylinositol trisphosphate, la PDK phosphoryle et active Akt, inhibant le relargage du cytochrome c, et par conséquent l'apoptose. L'activation de Akt est également responsable de l'inhibition de la caspase-9 par sa phosphorylation directe et initie l'activation de NF- κ B par la phosphorylation de la I κ B-kinase (594).

Enfin, un autre exemple du rôle des phosphoinositides dans la régulation de la signalisation pro-apoptotique de Fas implique SHIP-1 (SH2 (Src homology 2)-containing inositol 5'-phosphatase-1), responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, généré par la PI3K. Une fraction de SHIP-1, localisée au niveau du réticulum endoplasmique, est à l'origine de la glycosylation de Fas. Cette modification post-traductionnelle, qui n'implique pas l'activité phosphatase de SHIP-1 mais son domaine SH2, inhibe la capacité d'oligomérisation de Fas à la suite de son activation, empêchant la formation du DISC et l'initiation de la signalisation apoptotique. *In vivo*, le modèle murin déficient en SHIP-1 présente des altérations immunitaires, à savoir une myéloprolifération, un lymphome B, ainsi qu'une réduction du taux de lymphocytes T. Ces données confirment l'importance de la régulation de la signalisation pro-apoptotique de Fas dans le contrôle du fonctionnement immunitaire (595).

II.5. L'implications physio-pathologiques du système Fas/FasL

II.5.1. Fonction physiologique : rôles dans la régulation du système immunitaire

II.5.1.1. La chimiotaxie des phagocytes et l'élimination des cellules apoptotiques

L'activation du récepteur Fas par FasL induit la mort des cellules compromises, infectées par un agent pathogène ou pré-cancéreuses, par apoptose et contribue à leur élimination par les phagocytes. L'élimination rapide et efficace des cellules apoptotiques et des débris associés limite le développement d'une réponse inflammatoire, ainsi que la mobilisation du système immunitaire et participe au maintien de l'homéostasie du microenvironnement cellulaire. En effet, l'activation du récepteur Fas, en plus de la signalisation apoptotique, induit le déclenchement de la voie de signalisation NF- κ B. Ce mécanisme est médié par l'intermédiaire de l'activation de la

kinase RIPK1 et modulé par les protéines anti-apoptotiques IAP1 et IAP2. Les cellules mourantes par apoptose expriment et sécrètent alors de multiples cytokines et chimiokines, telles que IL-6, IL-8, CXCL1, MPC-1 (monocyte chemoattractant protein-1) et GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) (510). Ces molécules s'apparentent à des signaux d'attraction (« find me ») et de reconnaissance pour les phagocytes. Leur production favorise la chimiotaxie de ces cellules immunitaires et leur capacité de phagocytose et d'élimination appropriée des cellules apoptotiques (510).

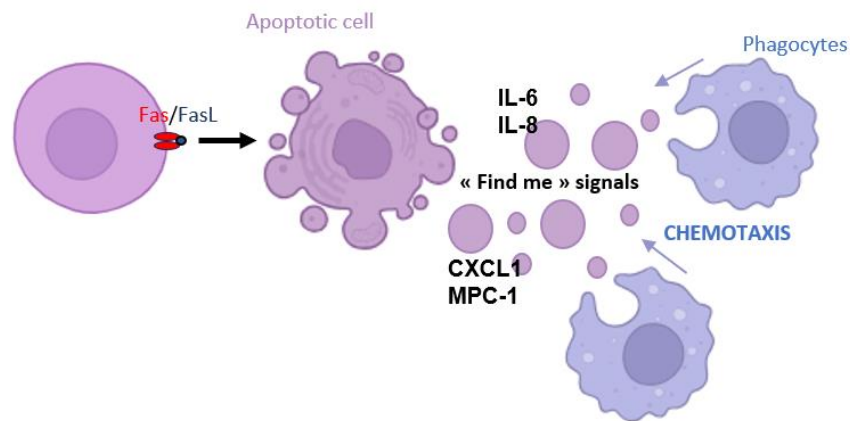


Figure 35 : Fas promeut l'attraction de phagocytes et l'élimination des cellules apoptotiques via l'induction de la production de cytokines et de chimiokines

II.5.1.2. L'homéostasie des lymphocytes et la régulation de l'auto-immunité et du développement tumoral

Le système Fas/FasL joue un rôle majeur dans la régulation de la durée et de l'intensité de la réponse immunitaire, ainsi que dans l'homéostasie des lymphocytes T, contrôlant l'auto-immunité et le développement tumoral.

Les influx calciques via les canaux CRAC (calcium release-activated calcium channels) constituent des signaux essentiels à l'activation, la prolifération et la fonction sécrétoire des lymphocytes T. Ces influx calciques sont responsables de l'activation des facteurs de transcription NFAT, activateurs des lymphocytes naïfs, et induisent la synthèse d'interleukine IL-2 (596). L'activation simultanée du TCR et du récepteur Fas semble favoriser l'activation et la prolifération des lymphocytes T, et stimuler la production d'IL-2, en modulant positivement les mécanismes moléculaires décrits (409). A l'inverse, l'activation séquentielle de Fas, puis du TCR, environ une heure après l'agrégation membranaire du récepteur, inhibe l'activation des lymphocytes T. L'activation du récepteur Fas, alors associée à la production de céramide, bloque les influx calciques et donc la production d'interleukine IL-2. Le récepteur Fas apparaît alors comme un co-régulateur du TCR dans l'activation des lymphocytes T (409).

La contraction immune correspond à la phase terminale de la réponse immunitaire, lors de laquelle les lymphocytes T suractivés ou auto-réactifs sont éliminés par apoptose, tout en préservant les lymphocytes T mémoire (597). Cet arrêt contrôlé de la réponse immunitaire par

apoptose des lymphocytes T correspond à la RICD (« restimulation-induced cell death ») et est indispensable au maintien de la tolérance périphérique (598). En contexte classique d'extinction de la réponse immunitaire, la mort des lymphocytes T implique majoritairement la diminution de cytokines pro-survies dans le microenvironnement (IL-2, IL-7), ainsi que la voie mitochondriale de l'apoptose dépendante de la protéine pro-apoptotique Bim. La RICD dépendante du système Fas/FasL intervient seulement dans le cadre d'une auto-immunité ou d'une infection chronique, à la suite du contact répétitif de faible affinité entre le complexe CMH/antigène et le TCR. L'augmentation de l'expression de Fas et de FasL à la surface des lymphocytes T activés permet alors d'induire leur élimination via la voie extrinsèque de l'apoptose. La RICD dépendante du système Fas/FasL joue donc un rôle tardif dans l'élimination des lymphocytes T et peut uniquement permettre de limiter la propagation ou l'aggravation potentielle de certaines réactions auto-immunes ou inflammatoires en place (487).

Enfin, l'expression constitutive de FasL dans certains tissus à privilège immun, comme les testicules, l'utérus, l'œil, le placenta et le système nerveux central, suggère que le système Fas/FasL joue également un rôle important dans la réduction de l'activité des cellules immunes dans ces tissus (505).

II.5.1.3. L'élimination des cellules compromises

L'induction de l'apoptose des cellules compromises (notamment pré-cancéreuses ou infectées par un agent pathogène) par les lymphocytes cytotoxiques, constitue un mécanisme efficace d'élimination de ces cellules afin d'empêcher le développement de pathologies infectieuses ou cancéreuses.

FasL n'est pas exprimé à la surface des lymphocytes T naïfs. Son expression augmente rapidement après l'activation des lymphocytes T, à la suite de la liaison du TCR avec son épitope de prédilection (599). Par conséquent, leur capacité à activer le récepteur Fas exprimé à la surface de cibles cellulaires est optimisée, favorisant l'induction de la mort par apoptose de ces cellules. Ce processus est démontré au sein de nombreux organes murins, tels que le foie. Dans un contexte précancéreux de NASH (« Non-alcoholic steatohepatitis »), les lymphocytes T activés entrent en contact avec les hépatocytes précancéreux via le système Fas/FasL. À la suite de l'activation du récepteur Fas par FasL des lymphocytes T, la signalisation apoptotique est déclenchée. Les cellules pré-cancéreuses sont alors éliminées par apoptose, contribuant au maintien de l'homéostasie tissulaire. S'il est désormais admis que Fas participe au développement tumoral (cf. partie « II.5.2. Fonctions pathologiques »), ces données ont initialement suggéré une classification du récepteur en tant que suppresseur de tumeur (600).

De manière similaire aux lymphocytes T, les lymphocytes B expriment FasL à leur surface et son niveau d'expression corrèle avec le niveau d'activation de ces cellules. Elles sont également

capables d'induire l'apoptose de cibles cellulaires exprimant le récepteur Fas, contribuant à l'efficacité de la réponse immunitaire et au maintien de l'intégrité de l'organisme (601).

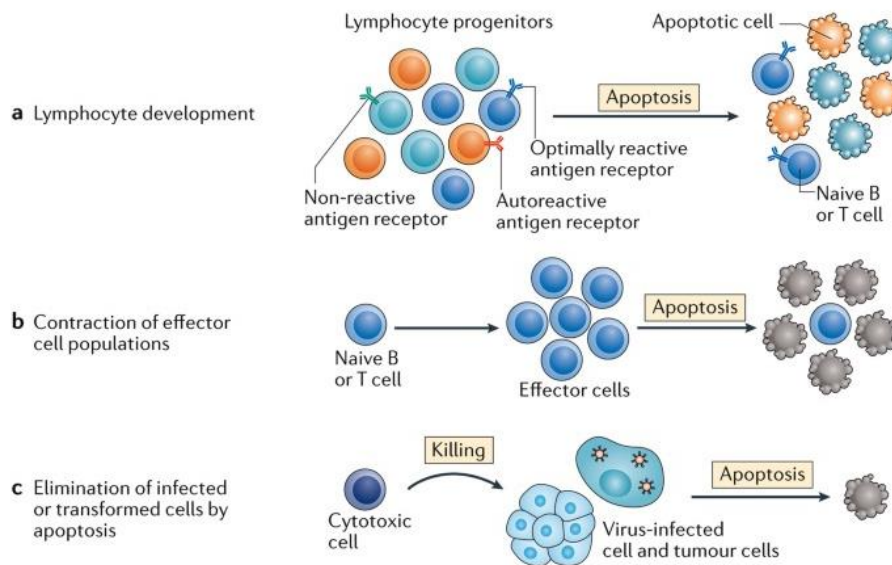


Figure 36 : L'apoptose, pouvant être induite par Fas, dans la réponse immunitaire (602)

II.5.1.4. L'homéostasie des cellules dendritiques et présentation d'antigènes

L'amplitude de la réponse immunitaire est également conditionnée par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures expriment le récepteur Fas et son activation est responsable de la maturation de ces cellules immunitaires, stimulant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité, ainsi que des molécules de co-stimulation B7-1/2, et induisant leur fonction sécrétoire de cytokines, en particulier IL-1 β et TNF- α . Le système Fas/FasL est donc impliqué dans le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, régulant ainsi l'amplitude de la réponse immunitaire (603). Cette réponse immunitaire, qui se veut transitoire, se termine par l'élimination des cellules dendritiques par apoptose. Le niveau d'expression du récepteur Fas des cellules dendritiques matures augmente, favorisant son activation par interaction avec FasL exprimé à la surface des lymphocytes T activés. A nouveau, l'élimination des cellules immunitaires par apoptose s'avère essentielle pour prévenir l'auto-immunité délétère (604).

L'importance du système Fas/FasL dans la régulation de la fonction immunitaire suppose que des perturbations de ces mécanismes peuvent être associées à des pathologies auto-immunes et au développement de cancers. Le système Fas/FasL apparaît donc une cible thérapeutique d'intérêt dans le cadre de ces maladies (396).

Par ailleurs, le récepteur Fas serait impliqué dans deux autres fonctions physiologiques très spécifiques qui ne seront pas développées dans ce mémoire : l'induction de la prolifération

neuronale dans certains types de neurones (notamment sensoriels et du gyrus denté) et le contrôle de la néovascularisation sous-rétinienne (605-607).

II.5.2. Les fonctions pathologiques

II.5.2.1. Les maladies auto-immunes

Des perturbations de la signalisation de mort cellulaire par apoptose sont responsables de la dérégulation de la réponse immunitaire, en particulier la persistance de lymphocytes auto-réactifs. Ce dérèglement est provoqué par des mutations, héréditaires ou acquises, de gènes, codant alors pour des protéines structurellement et fonctionnellement altérées. Ces protéines correspondent aux acteurs de la signalisation apoptotique. Certaines mutations du gène codant pour le récepteur Fas induisent une déstabilisation de la localisation membranaire du récepteur, à l'origine de la diminution de son expression en surface. D'autres mutations sont responsables de changements conformationnels du domaine de mort de Fas, impactant son oligomérisation membranaire et les interactions avec ses effecteurs intracellulaires. Il en découle une altération de sa capacité à déclencher et transmettre la signalisation apoptotique (608) L'inefficacité fonctionnelle du récepteur Fas conduit à une inhibition de la mort par apoptose des cellules immunitaires, empêchant l'arrêt de la réponse immunitaire (RICD). La progressive accumulation des lymphocytes dans le sang et les organes lymphoïdes périphériques entraîne alors le développement de réactions auto-immunes, pouvant aboutir à la pathologie du syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS) (428). De manière moins fréquente, des mutations affectant d'autres acteurs de la signalisation apoptotique ont été identifiées chez des patients atteints de ALPS, tels que FasL et la caspase-10 (609).

Le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité est un trouble systémique et héréditaire rare de l'homéostasie lymphocytaire, caractérisé par une lymphoprolifération chronique, et par conséquent, par un taux élevé de lymphocytes T matures T $\alpha\beta$ CD3+ doubles négatifs CD4-CD8-, en particulier dans la zone paracorticale des ganglions lymphatiques (610). Au niveau symptomatique, l'ALPS se manifeste par une lymphadénomégalie, à savoir une augmentation de la taille des nœuds lymphatiques périphériques, ainsi que par une hépatosplénomégalie, correspondant à une augmentation simultanée du volume du foie et de la rate. Ce syndrome est également associé à des manifestations auto-immunes chez plus de deux tiers des patients, notamment de type hématologique (anémie hémolytique, thrombopénie et neutropénie). De manière plus rare, des auto-anticorps spécifiques de certains types cellulaires sont exprimés, induisant des atteintes d'organes ou de systèmes, telles que des glomérulonéphrites, des hépatites, des uvéites et un syndrome de Guillain-Barré. Enfin, cette pathologie est associée à un risque accru de malignité lymphoïde (611-613).

Des mutations des gènes codant pour Fas et FasL sont également associées à certaines formes de lupus érythémateux systémique (SLE). A nouveau, ces mutations sont responsables d'une inhibition de la mort par apoptose des cellules immunitaires. Les altérations de ces mécanismes empêchent l'arrêt de de la réponse immunitaire (RICD) et provoquent l'accumulation de lymphocytes auto-réactifs. De plus, un taux élevé de FasL soluble est détecté dans le sérum de ces patients, à l'origine d'une aggravation de la pathologie (505).

Le lupus est une maladie systémique rare qui peut affecter toutes les régions du corps humain, telles que la peau, les articulations, et/ou les organes internes. Les patients sont susceptibles de développer une leucopénie, une thrombocytopénie, une anémie hémolytique et des néphrites. La présence d'une grande diversité d'auto-anticorps est la caractéristique majeure du lupus, retrouvés chez 98% des patients (505).

L'identification des mutations des acteurs du déclenchement de la signalisation apoptotique a abouti à la génération de modèles murins pour l'étude des pathologies auto-immunes qui en découlent. Le modèle murin MRL/lpr (Murphy Roths Large/lymphoprolifération) correspond à la modélisation du SLE, caractérisé par une mutation récessive autosomale du chromosome 10, au niveau du gène codant pour le récepteur Fas. La découverte d'une seconde mutation autosomale récessive du chromosome 1, au niveau du gène codant pour FasL, a abouti à la génération du modèle murin MRL/gld, pour maladie lymphoproliférative généralisée. Désormais, une grande diversité de modèles existe pour le criblage génétique et l'étude des aspects cellulaires des pathologies auto-immunes systémiques associées aux mutations des acteurs de la signalisation apoptotique (614).

Par ailleurs, il apparaît de plus en plus évident que les mutations affectant le récepteur Fas sont associées à des altérations plus significatives de la signalisation apoptotique que les mutations associées à FasL. Ces données apportent une explication quant aux différences de pénétrance et de phénotype clinique entre les patients porteurs de mutations du gène de Fas et ceux porteurs de mutations du gène de FasL. A ce jour, aucune mutation hétérozygote du gène de FasL ne semble être impliquée dans un phénotype clinique. L'importance actuelle attribuée à ces mutations, en particulier dans le diagnostic de l'ALPS, pourrait donc masquer d'autres potentielles anomalies génétiques et ne permettrait pas d'apporter un traitement approprié aux patients (615).

A l'inverse des maladies auto-immunes systémiques, l'auto-immunité spécifique d'organe est caractérisée par une auto-agression d'un type cellulaire spécifique dans un organe donné, affectant l'intégrité et le fonctionnement du tissu. Les patients se caractérisent alors par un taux élevé d'auto-anticorps spécifiques de l'organe ciblé. Des processus apoptotiques excessifs médiés via l'interaction Fas/FasL peuvent alors conduire au développement de pathologies telles que le diabète sucré insulino-dépendant, la colite ulcéreuse, la sclérose en plaques et le syndrome de Sjögren (616-618). Les dérégulations de la RICD et l'augmentation du taux de FasL

solubles chez ces patients contribuent également aux processus pathologiques auto-immuns spécifiques d'organe (619).

II.5.2.2. Les cancers

Signalisation pro-tumorale du récepteur Fas

La voie de signalisation apoptotique extrinsèque induite par l'activation du récepteur Fas joue un rôle essentiel dans l'élimination des cellules compromises, notamment pré-cancéreuses, médiée par le système immunitaire. Par conséquent, des défauts de la signalisation apoptotique contribuent à la tumorigenèse en limitant l'efficacité du système immunitaire dans la surveillance immunitaire anti-tumorale (620). Les cellules cancéreuses adoptent des stratégies afin d'échapper à la surveillance immunitaire et à la mort cellulaire par apoptose, comme des modifications de l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques (301). Tandis que l'expression des inhibiteurs de l'apoptose (IAP) et de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont modulées positivement, l'expression du récepteur Fas à la surface cellulaire est diminuée. Ces perturbations d'expression protéique inhibent significativement le déclenchement de la signalisation apoptotique (302). De plus, de nombreuses mutations du gène codant pour le récepteur Fas ont été identifiées au sein de tumeurs malignes hématologiques et solides (303-305). Ces mutations sont principalement localisées au sein des exons 8 et 9 du gène codant pour le récepteur Fas, correspondant au domaine de mort de la protéine. Des altérations de ce domaine, perturbant l'agrégation membranaire du récepteur et les interactions avec ses effecteurs intracellulaires, inhibent le déclenchement de la signalisation apoptotique et la mort des cellules cancéreuses par apoptose. Ces processus contribuent donc à la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose et à l'échappement tumoral (301).

Les perturbations de l'activation du récepteur Fas peuvent également conduire au déclenchement de voies de signalisation non-apoptotiques en faveur d'un contexte pro-inflammatoire et de la prolifération tumorale. En parallèle de la signalisation apoptotique, le récepteur Fas peut induire l'activation de la voie de signalisation non-apoptotique NF- κ B. Le récepteur activé permet le recrutement de FADD et de la caspase-8, à l'origine de l'activation de complexe IKK, puis du facteur de transcription NF- κ B. Ce facteur de transcription joue un rôle majeur dans la production de cytokines pro-inflammatoires et dans la modulation positive de la survie, de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Dans ce contexte, la signalisation NF- κ B, induite par activation du récepteur Fas, est associée au développement de conditions pathologiques, telles que le cancer et l'inflammation chronique (425).

D'autre part, le recrutement de l'inhibiteur des caspases initiatrices c-FLIP est responsable de l'inhibition de la voie de signalisation apoptotique et l'activation de la cascade de signalisation des MAP kinases, RAF-1/MEK/ERK, qui régule la croissance, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaires, à l'origine du développement de multiples tumeurs (496).

L'activation de Fas est également associée à l'induction d'un processus dépendant d'influx calciques, à l'origine de l'activation de la cascade moléculaire c-yes/PLC γ 1/PI3K/Akt. Cette signalisation pro-migratoire est notamment décrite dans le cadre du cancer du sein triple négatif et de modèles murins de glioblastomes (417, 424).

Dans le cancer du côlon, le récepteur Fas activé promeut la formation de protrusions cellulaires. En effet, il favorise l'activation de la phospholipase C- γ 1, phosphorylée via le récepteur β du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFRB), à l'origine de l'hydrolyse du phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. Cette réaction libère de la membrane plasmique la protéine déstabilisante de l'actine cofiline. De plus, l'inhibition constitutive de la kinase LIMK1 par KRAS/RAF1 dans les cellules cancéreuses colorectales assure le maintien des processus de remodelage du réseau d'actine cortical dépendant de la cofiline. Le récepteur Fas est donc à l'origine de mécanismes moléculaires responsables de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses (621).

Enfin, la forme soluble de FasL, produite à partir du clivage de FasL membranaire par les métalloprotéinases, pourrait activer le récepteur Fas et induire la formation du complexe alternatif MISC, à l'origine du déclenchement d'une voie de signalisation pro-survie, notamment dans les cellules du cancer du sein (417).

Maintien des cellules souches cancéreuses

Deux modèles s'opposent concernant les processus cellulaires responsables de la tumorigénèse. L'un des deux modèles propose que l'accumulation de mutations aléatoires, conférant aux cellules des propriétés de prolifération indéfinie et la capacité de former un clone tumoral, peut se produire dans toutes cellules d'un tissu, même si celles-ci sont différenciées. A l'inverse, le modèle hiérarchique considère que le moteur de l'activité tumorigène est la cellule souche cancéreuse (CSC). Les cellules cancéreuses ont alors un potentiel de prolifération limité, tandis que les CSC sont responsables de la production de toutes les autres cellules de la masse tumorale. La capacité d'auto-renouvellement des CSC permettrait d'expliquer la réapparition de cancers, parfois plusieurs années après rémission. L'élucidation des mécanismes moléculaires du maintien des CSC apparaît donc essentiel pour comprendre la persistance de certains cancers et les échecs thérapeutiques associés (622).

Les analyses du profil d'expression génétique des cellules souches embryonnaires humaines ont permis de caractériser Fas et les acteurs de la signalisation associés comme des marqueurs des cellules souches (623). De plus, les données obtenues sur la fonction de Fas dans les cellules souches non cancéreuses ont suggéré un rôle non-apoptotique du récepteur dans les CSC (624).

Le récepteur Fas assure l'émergence de nouvelles CSC afin de maintenir cette population cellulaire. Cette activité de reprogrammation dépendante du récepteur Fas est indépendante de la voie de signalisation apoptotique. Au sein des cellules gastro-intestinales, le système Fas/FasL

induit l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK à l'origine de l'inhibition de la kinase GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) par phosphorylation. Ce mécanisme moléculaire favorise l'activation nucléaire et la formation du complexe AP-1/NFAT4. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de ce complexe contribue à l'accumulation nucléaire du facteur de transcription Snail et de la β -caténine, ainsi que l'expression du miR-23a. L'association de Snail avec la β -caténine module alors négativement l'expression de la E-cadhérine et positivement l'expression de la MMP9 et de la vimentine *in vivo* et *in vitro*. La voie de signalisation MAPK/ERK, associée à l'expression de Snail et de la β -caténine, dépendante de l'activation du récepteur Fas, est donc à l'origine de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules gastro-intestinales, donnant naissance à des cellules cancéreuses aux propriétés de CSC (625). Outre les cellules épithéliales, l'activation du récepteur Fas stimule la conversion de cellules souches saines en cellules souches cancéreuses (626).

Enfin, les voies de signalisation non-apoptotiques associées au récepteur Fas inhibent la différenciation des CSC, renforçant à nouveau le rôle de Fas dans le renouvellement des CSC et la stabilité de cette population cellulaire (627).

II.6. Le système Fas/FasL en thérapie

Différentes stratégies thérapeutiques émergentes et brevetées ont été mises au point, exploitant le rôle du système Fas/FasL dans la physiopathologie des maladies auto-immunes et des cancers.

II.6.1. Les stratégies thérapeutiques dans les maladies auto-immunes

Les traitements standardisés des maladies auto-immunes impliquent majoritairement des corticostéroïdes, des immunosuppresseurs et des anti-inflammatoires (505).

Des protéines de fusion, telles que CTLA4-FasL, sont également utilisées pour le traitement des manifestations inflammatoires et des maladies auto-immunes. CTLA4-FasL interagit avec les récepteurs B7 et Fas exprimés à la surface des lymphocytes auto-réactifs. L'association avec le récepteur B7 favorise la reconnaissance spécifique de ces cellules immunitaires. En parallèle, l'activation du système Fas/FasL conduit à leur mort par apoptose, selon un processus similaire à l'arrêt de la réponse immunitaire en contexte physiologique (RICD). La protéine de fusion CTLA4-FasL est donc à l'origine de l'inhibition de l'auto-immunité via l'élimination des lymphocytes auto-réactifs pathogènes. De plus, elle contribue à limiter l'inflammation en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules. Cependant, le ciblage spécifique des lymphocytes auto-réactifs persistants s'avère complexe. Ces thérapies sont donc susceptibles de perturber les fonctions de reconnaissance des antigènes du non-soi et d'altérer les capacités de réaction du système immunitaire pour lutter contre les agents pathogènes (628).

II.6.2. Les stratégies thérapeutiques anti-cancers

L'approche d'immunothérapie active correspond aux traitements anti-cancers renforçant la réponse immunitaire du patient. La fusion génétique artificielle du GM-CSF et du ligand du récepteur Fas produit une protéine chimère efficace dans cette mobilisation du système immunitaire pour lutter contre la tumeur. Une réduction de la croissance tumorale dans des modèles murins de cancers du poumon est observée, ainsi qu'une augmentation significative du taux de survie de ces animaux. Le facteur de stimulation du système immunitaire GM-CSF assure le recrutement et la maturation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. FasL, quant à lui, est responsable de l'activation de Fas et des voies de signalisation non-apoptotiques associées, en faveur de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, renforçant ainsi le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site de la tumeur. L'action de ces deux composants, en synergie, favorise l'élimination des cellules cancéreuses via la stimulation du système immunitaire du patient. L'injection de la protéine de fusion FasL/GM-CSF constitue donc une méthode de vaccination thérapeutique anti-cancer prometteuse dans l'activation d'une réponse anti-tumorale spécifique (629).

L'approche d'immunothérapie passive ne consiste pas à cibler le système immunitaire du patient. L'agent thérapeutique administré attaque directement les cellules cancéreuses, tel que la protéine de fusion composée de l'anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre le récepteur Fas à la surface des cellules cancéreuses, fusionné à un agent chimiothérapeutique, en particulier l'anti-métabolite 5-Fluorouracile. L'objectif thérapeutique de cette synergie est de combiner l'effet pro-apoptotique de l'anticorps anti-Fas, qui active le récepteur et déclenche la voie de signalisation apoptotique au sein des cellules cancéreuses, et l'effet anti-cancer de l'anti-métabolite. Cette protéine de fusion est à l'essai sur des patients atteints de cancers du côlon. Les résultats obtenus à ce jour s'avèrent particulièrement encourageants, démontrant une très nette diminution de la prolifération tumorale chez les patients traités (630).

Une autre étude démontre le potentiel thérapeutique anti-tumoral d'un polypeptide généré à partir du récepteur Fas. Ce polypeptide correspond à une partie de l'extrémité intracellulaire du récepteur, comprenant le domaine de mort. Ce fragment est produit à la suite du clivage protéolytique de Fas par la protéine catalytiquement active ELANE (neutrophil elastase), libérée par les neutrophiles. Le polypeptide issu du récepteur Fas interagit avec l'histone H1, particulièrement exprimée au sein des cellules cancéreuses, induisant une augmentation de la production de ROS, la modulation positive des effecteurs de la signalisation apoptotique et l'inhibition des voies de signalisation pro-survie. L'interaction de ce polypeptide avec l'histone H1 assure une élimination sélective des cellules cancéreuses, tout en préservant les cellules saines. *In vivo*, ELANE induit une diminution de la croissance tumorale dans de nombreux types de cancers et stimule le recrutement des lymphocytes T au niveau des sites de métastases (631).

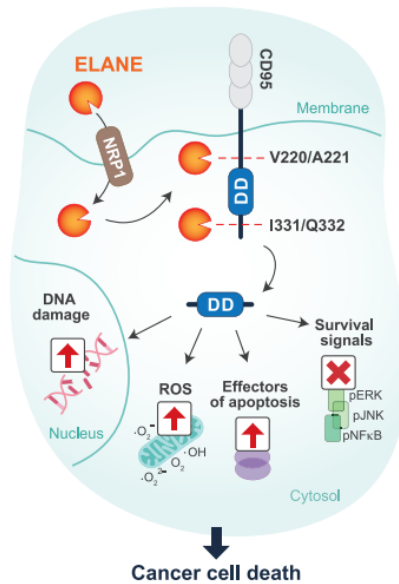


Figure 37 : Effets anti-cancers du polypeptide issu du clivage du récepteur Fas par ELANE (adaptée de (631))

L'induction de la signalisation apoptotique associée à Fas apparaît donc comme une stratégie thérapeutique efficace dans l'élimination des cellules cancéreuses. Cependant, la résistance de certaines cellules cancéreuses à l'apoptose ou des conditions favorisant la signalisation pro-survie du récepteur nécessite l'existence d'alternatives thérapeutiques, correspondant à l'inhibition du système Fas/FasL. Un essai clinique de phase II démontre le potentiel thérapeutique d'une telle stratégie. La molécule APG101 est composée du domaine extracellulaire de Fas fusionné avec un anticorps IgG. Cette protéine de fusion cible et neutralise FasL. Elle rétablit alors le processus de surveillance immunitaire anti-tumorale et réduit significativement l'invasion des cellules cancéreuses du glioblastome *in vitro* et *in vivo*. De plus, la protéine Fas-Fc présente un excellent profil de sécurité et est très bien tolérée par les patients traités.

Un taux particulièrement élevé de la méthylation CpG20 dans le promoteur de FasL a été détecté chez les patients réagissant le mieux au traitement par APG101. Cette méthylation constitue donc un biomarqueur de prédiction de l'efficacité de la thérapie et offre des perspectives de médecine personnalisée dans le traitement des cancers. Les méthodes thérapeutiques basées sur l'inhibition du système Fas/FasL présentent également l'intérêt majeur de limiter l'impact délétère et pro-tumorale que peut avoir l'apoptose des cellules cancéreuses sur les cellules environnantes, notamment par le biais de l'AIP (632).

Enfin, le système Fas/FasL peut s'avérer problématique dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques innovantes anti-cancers. Le transfert adoptif de cellules implique le prélèvement de cellules immunitaires d'un patient, leur modification génétique et leur ré-administration dans la circulation sanguine de ce dernier. En particulier, la modification génétique des lymphocytes T aboutit à la production de cellules CAR-T (« chimeric antigenic receptor-T »), exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR) à leur surface. Ce récepteur assure une reconnaissance

spécifique des cellules tumorales, favorisant leur élimination par le système immunitaire. Cependant, il est démontré que les cellules CAR-T présentent une augmentation du niveau d'expression du récepteur Fas et de FasL, résultant en l'activation de la voie de signalisation apoptotique. La mort par apoptose des cellules CAR-T est alors indépendante du CAR et de l'activation du TCR. Dans ce contexte, le rôle du système Fas/FasL dans l'élimination des cellules immunitaires, indispensable au contrôle de la réponse immunitaire en contexte physiologique, constitue une limite au développement de cette thérapie. Si les cellules CAR-T sont désormais approuvées par la FDA (U.S. Food and Drug Administration), des optimisations de leur persistance dans l'organisme des patients pourraient donc reposer sur un ciblage des acteurs de la signalisation apoptotique (633).

Des avancées récentes ont été faites en ce sens. Des cellules CAR-T exprimant une protéine de fusion composée de la partie extracellulaire du récepteur Fas et de la partie intracellulaire du récepteur de co-stimulation 4-1BB ont été produites. L'activation du récepteur Fas à la surface de ces cellules CAR-T est donc à l'origine, non pas du déclenchement de la signalisation apoptotique associée à Fas, mais de la signalisation pro-survie associée au récepteur de co-stimulation 4-1BB, renforçant leur prolifération, et par conséquent leur persistance et leur efficacité dans la lutte contre la tumeur. L'expression de cette protéine de fusion par les cellules CAR-T favorise grandement leur fonction anti-tumorale dans des modèles *in vivo* de leucémie et de cancer du pancréas. Ces optimisations paraissent donc très prometteuses pour la stratégie thérapeutique de transfert adoptif de cellules immunitaires (634).

II.6.3. Biomarqueur dans le diagnostic des maladies auto-immunes et des cancers

Outre son potentiel curatif, l'implication du récepteur Fas et de son ligand FasL dans le développement tumoral et les maladies auto-immunes peut être mis à profit pour le diagnostic de ces pathologies. Les patients atteints d'ALPS présentent un taux de FasL soluble particulièrement élevé dans le sérum. Cette caractéristique clinique fait désormais partie des nouveaux critères diagnostiques dans la procédure d'identification des patients atteints de ce syndrome auto-immun. FasL soluble apparaît alors comme un biomarqueur fiable contribuant à l'établissement du diagnostic d'ALPS (635).

FasL soluble constitue également un biomarqueur pour le diagnostic et le suivi de l'évolution de patients atteints de cancers thyroïdiens, ainsi que pour la prédiction et l'évaluation des risques de récurrence du cancer (636). Enfin, le récepteur Fas, en tant qu'initiateur de voies de signalisations pro-tumorales, représente un autre biomarqueur pronostique du cancer, notamment dans le diagnostic et le suivi de l'évolution du glioblastome. L'expression de Fas est augmentée au sein des cellules tumorales et lors de la récurrence. Le récepteur Fas assure ainsi le maintien des taux de transcrits associées à la transition épithélio-mésenchymateuse, via l'induction de voie de signalisation pro-survie oncogène PI3K. Le niveau d'expression de Fas corrèle donc avec le taux de TEM et reflète l'activité tumorigène (637).

Le système Fas/FasL et les manipulations thérapeutiques de ce dernier apportent donc de nouvelles perspectives en recherche clinique, que ce soit dans un but de diagnostic ou de thérapie, et en particulier dans la lutte contre les cancers et les maladies auto-immunes.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET QUESTIONNEMENTS

Les récepteurs du TNF (TNFR) jouent un rôle clé dans différentes fonctions physiologiques, incluant la régulation du système immunitaire (365, 366). En particulier, le récepteur Fas est un récepteur de mort appartenant aux TNFR et un acteur majeur du contrôle de la réponse immunitaire, prévenant le développement de phénomènes inflammatoires et assurant l'élimination des cellules compromises, infectées ou cancéreuses. La majorité de ces processus impliquent sa signalisation apoptotique (410, 510, 601-604).

La mort cellulaire par apoptose augmente la production des VE, qui assurent la mise en place de réponses cellulaires adaptatives à l'échelle de l'organisme (12, 13, 20, 22, 129, 149, 150, 177, 186). Fas, en tant qu'inducteur de la signalisation apoptotique, pourrait donc être impliqué dans la production des VE apoptotiques. Néanmoins, cet aspect de la signalisation de Fas n'a jusqu'alors pas été étudié.

L'apoptose médiée par le récepteur Fas génère-t-elle des apo-exosomes ?

Le contenu des VE, et notamment celui des exosomes, est dépendant du type cellulaire et du contexte physiologique. En effet, le processus apoptotique, qui enclenche la formation des apo-exosomes, aboutit à la modification de leur contenu, et par conséquent de leurs fonctions (22, 141, 144, 181). Si le processus de formation des VIL reste similaire à celui des exosomes non-apoptotiques, la spécificité du mécanisme de biogenèse des apo-exosomes semble résider dans l'engagement des effecteurs de la signalisation apoptotique, en particulier des caspases, même si leur rôle exact reste à clarifier (12, 22). De plus, à notre connaissance, aucune étude comparative du contenu et des fonctions des apo-exosomes générés par différents types cellulaires et divers stimuli apoptotiques (type de récepteurs de mort ou de stress génotoxiques) n'a été réalisée.

Les quelques études menées sur le système Fas/FasL dans les VE révèlent la présence de FasL à la surface des VE sécrétées par les cellules immunitaires et s'accordent sur leur rôle essentiel dans la suppression immune, afin de prévenir le développement de réactions inflammatoires et auto-immunes (204-206). FasL à la surface des VE interagit avec Fas exprimé à la surface des cellules immunitaires, en particulier des lymphocytes cytotoxiques. Cette interaction induit le déclenchement de la signalisation apoptotique chez les lymphocytes et provoque leur élimination par apoptose. Ces VE renforcent l'action du système Fas/FasL dans l'inhibition coordonnée de l'activité des cellules immunitaires (204-206).

FasL est également présent à la surface d'exosomes issus de cellules cancéreuses. A nouveau, ces exosomes sont capables de provoquer l'élimination des lymphocytes T par le déclenchement de la signalisation apoptotique. En éliminant les cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral, ces exosomes favorisent l'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire, et par conséquent, la prolifération tumorale (289, 638).

Concernant la présence du récepteur Fas dans les VE, une seule étude mentionne la forte présence de Fas dans les exosomes de la circulation sanguine de patients ayant subi un accident vasculaire cérébral ischémique. Une forte concentration des exosomes enrichis en récepteur Fas semble être associée à un mauvais pronostic, suggérant un transfert de Fas et de son signal via les exosomes dans la circulation sanguine (639). Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne décrit les mécanismes de production des VE qui présenteraient Fas à leur surface et qui leur confèreraient une fonction particulière. Du fait de l'importance de l'apoptose médiée par le système Fas/FasL dans la régulation du système immunitaire ou dans l'élimination de cellules compromises, la compréhension des mécanismes de genèse de ces VE, ainsi que de leurs fonctions, est un enjeu majeur.

Dans ce contexte, une analyse protéomique réalisée par le laboratoire révèle l'ensemble des molécules interagissant avec le domaine de liaison PDZ de Fas, dont 19 protéines disposant d'un domaine PDZ. Ces protéines incluent Synténine-1, HSP70 et HSC70, impliquées dans les mécanismes de biogenèses des exosomes et/ou considérées comme des marqueurs caractéristiques de cette catégorie de VE. Les données du laboratoire renforcent donc l'hypothèse du rôle de Fas dans la production des apo-exosomes et suggèrent l'implication des molécules identifiées dans leur mécanisme de biogenèse. En particulier, la Synténine-1 est responsable d'un mécanisme moléculaire majeur de formation des exosomes et du transport des récepteurs transmembranaires (125, 128, 640). La Synténine-1 apparaît donc comme un acteur potentiel de l'incorporation de Fas dans les apo-exosomes au cours de son transport endosomal.

Dans quelles mesures le transport intracellulaire de Fas est-il important dans la signalisation de Fas et la genèse des apo-exosomes ?

La signalisation de Fas, comme celle de la plupart des récepteurs membranaires, est modulée par son endocytose et son trafic intracellulaire via le système endosomal (23). Plusieurs études, dont certaines menées au laboratoire, démontrent que l'internalisation du récepteur Fas est essentielle au déclenchement de sa signalisation apoptotique, son maintien à la membrane plasmique étant préférentiellement associé à sa signalisation non-apoptotique (467, 482, 493, 541, 563-569).

La membrane endosomale apparaît comme une plateforme propice à la transduction de la signalisation de nombreux récepteurs, incluant le récepteur Fas. L'endosome présente de nombreuses caractéristiques uniques et offrent des conditions particulières favorisant notamment le maintien de l'association ligand/récepteur, la proximité avec les effecteurs intracellulaires et la formation de complexes protéiques (23, 530). Les données actuelles suggèrent que, tout comme pour TNFR1, la localisation endosomale de Fas augmente le recrutement et l'activation de la caspase-8 (482). Le trafic endosomal de Fas semble donc être associé à une amplification de la signalisation apoptotique, potentiellement jusqu'à l'incorporation du récepteur dans les VIL et sa

dégradation. Il est donc possible de supposer que les cellules mourant par apoptose ne parviennent pas à dégrader de manière suffisamment efficace le récepteur Fas pour survivre à sa signalisation apoptotique, en particulier, au niveau endosomal.

En effet, de manière générale, le phénomène d'endocytose et le phénomène de dégradation qui s'ensuit permettent d'inhiber la signalisation en réduisant la concentration de récepteur disponible à la membrane plasmique et/ou en provoquant la dissociation du récepteur de son ligand et des modulateurs membranaires (23, 526-528). L'incorporation des récepteurs dans les VIL du MVB constitue également un moyen d'atténuation ou d'inhibition complète de leur signalisation, les isolant de leurs effecteurs cytoplasmiques (526-528). Enfin, la fusion du MVB avec le compartiment lysosomal dégradatif assure l'inhibition de leur signalisation via leur dégradation (23, 114).

En parallèle de la voie dégradative classique, le MVB peut échapper à la dégradation lysosomale et être voué à fusionner avec la membrane plasmique de la cellule. Les mécanismes de biogenèse des VIL et les acteurs du trafic endosomal, tels que les petites GTPases Rab, déterminent le devenir du contenu du MVB qui sera, soit dégradé après fusion avec le lysosome, soit libéré vers l'espace extracellulaire après fusion avec la membrane plasmique (11, 12, 116-119). La fusion du MVB avec la membrane plasmique est l'étape clé qui conditionne la production/sécrétion des exosomes et des apo-exosomes. Par conséquent, le transport endosomal de Fas et sa localisation au niveau de l'endosome tardif supposent son incorporation dans les VIL et sa sécrétion via les apo-exosomes lors l'apoptose. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur l'impact de l'activation de Fas et de sa présence dans l'endosome sur la production des apo-exosomes. Réciproquement, l'impact de l'incorporation de Fas dans les VIL sur sa signalisation apoptotique reste également inconnu.

Dans ce contexte, le projet de thèse, mené sous la direction du Dr. Laurent Gagnoux et du Dr. Anne-Odile Hueber, s'intéresse au devenir du récepteur Fas à la suite de son activation et son rôle dans la production de VE apoptotiques. Nos questionnements sont donc les suivants :

1°) L'apoptose par Fas induit-elle la genèse d'apo-exosomes et la Synténine-1 est-elle impliquée dans leur mécanisme moléculaire de formation ?

2°) Quels sont les mécanismes de transport intracellulaire qui sous-tendent cette formation ?

3°) Ces apo-exosomes présentent-ils un contenu et une fonction particulière ?

RESULTATS

Fas activation leads to biogenesis of apoptotic-exosome like vesicles expressing Fas and other immune regulatory receptors

Zoé Servant¹, Sébastien Huault¹, Aurélie Rossin¹, Gwendoline Maharaux¹, Anne-Sophie Gay², Sameh Ben Aicha³, Amel Mettouchi⁴, Anne-Odile Hueber¹, and Laurent Gagnoux-Palacios^{1*}

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, France.

² CNRS, IPMC, Plateforme d'analyse des biomolécules, France

³ Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, PRISM Imaging Facility, France.

⁴ Institut Pasteur, Département de Microbiologie, Unité des Toxines Bactériennes, Université Paris Descartes, Paris, France

* Corresponding author: L. Gagnoux-Palacios, Université Côte d'Azur Nice, Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR 7277, INSERM UMR 1091, Parc Valrose, Bâtiment des Sciences Naturelles, 06108 Nice Cedex2, France.

gagnoux@unice.fr

Abstract

Induction of apoptosis by Fas cell death receptor is involved in elimination of cancer cells by immune cells. Here we show that Fas activation in human epithelial cells leads to formation of various types of extracellular vesicles (EV) including apoptotic exosomes expressing Fas (Fas+Apo-Exo). We demonstrate that these specific EV generated within the endosomal machinery requires caspases activation and ESCRT accessory molecule Alix. Proteomic analysis revealed that Fas+Apo-Exo are loaded with Fas, and immune related molecules including MHC-I, CD70, CD47, ICAM-1 and CAR. Importantly, some of these molecules, including CD70 and CD47, co-aggregates with Fas in the same signaling complex at plasma membrane and are co-endocytosed with Fas, which explain their presence with Fas in Apo-Exo.

Altogether, our data suggests that EV secreted following Fas-mediated apoptosis may have an important immunomodulatory function by reinforcing T cells activation, acting as a positive feedback amplification loop which favors tumor cells elimination.

Introduction

EV are membrane-limited organelles that are secreted by all cells and they are now considered as an important contributor of cell communication by transferring to neighboring cells various bioactive molecules such as proteins, sugars, lipids, metabolites, and nucleic acid. Surface receptors present on EV allows the specific targeting of recipient cells and this interaction can either directly initiate a signaling at the cell surface and/or allow their internalization, transferring their content in the cell and influencing its function. Therefore, EV act as intercellular signaling vehicles to maintain tissue homeostasis or in response to pathological conditions (van Niel et al., 2018). Many examples demonstrate the importance of EV in different functions such as the modulation of the immune system, maintenance of cell stemness, embryo development, and inflammation (van Niel et al., 2018).

EV vary significantly in size, content, function, and biogenesis. Depending of their process of biogenesis, EV markers can vary as demonstrated by recent proteomic analysis (Castro-Cruz et al., 2023; Jeppesen et al., 2019; Kowal et al., 2016; Kugeratski et al., 2021; Willms et al., 2016). Some EV, called microvesicles (MV), are generated by budding and fission of the plasma membrane. Their size ranges from nanometer to micrometer scale. The mechanism of MV-formation relies on different molecular actors such the ESCRT-machinery, some tetraspanins (CD9 and CD81) and the actin cytoskeleton (Colombo et al., 2014). Exosomes are small EV (sEV) of 40-150 nm corresponding to intraluminal vesicles (ILV) formed by internal budding of the endosomal membrane during the maturation of the endosomal compartment called Multivesicular body (MVB). They are secreted after fusion of the MVB with the plasma membrane. Multiple pathways seem to operate on endosomal membranes to trigger endosomal invagination and scission to give rise to ILVs through ESCRT dependent or independent pathways (Colombo et al., 2014; van Niel et al., 2018).

During apoptosis, the process of EV biogenesis is associated to the dismantling of the cell resulting in the formation of different types of EV. Plasma membrane blebbing is believed to result in the release of large vesicles (>1 μm of diameter) called “apoptotic bodies” (Apo-bodies). Interestingly, several recent studies have shown that other vesicles of smaller sizes (from 30 to 100 nm) are also produced and described as “apoptotic exosomes-like vesicles”, called here Apo-Exo (Dieudé et al., 2015; Park et al., 2018; Sirois et al., 2011). Only few studies analyzed the mechanisms of Apo-Exo biogenesis, which seems to differ from classical exosomes and to be dependent of the apoptotic stimulus (Dieudé et al., 2015; Park et al., 2018).

Like for EV produced by normal cells, Apo-EV has been associated with diverse physiological functions. Apo-EV has been shown to promote cell proliferation in a context of stem cell maintenance and tissue regeneration (Brock et al., 2019; Hristov et al., 2004) and to have immunomodulatory functions. Indeed, Apo-EV from tumor cells have been shown to initiate anti-tumor immunity (Horrevorts et al., 2019) by transferring tumor antigens to antigen presenting cells (Muhsin-Sharafaldine et al., 2016). Moreover, Apo-Exo has been shown to mediate an

inflammatory response following apoptosis by activating secretion of inflammatory cytokines by macrophages (Park et al., 2018) and by modulating the lymphoid response (Dieudé et al., 2021; Dieudé et al., 2020).

The superfamily of TNF receptors (TNFR) plays a determinant role in the control of both inflammatory responses and cell death by apoptosis. Activation by their extracellular ligands of a subset of TNFR, called death receptors, leads to induction of apoptosis. Death receptors are key components of the immune response against pathological agents or tumor cells. Indeed, one of the two mechanisms used by cytotoxic lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) to eliminate compromised cells is to activate death receptors present at their surface by presenting or secreting death ligands (Rossin et al., 2019). Among the TNFR death receptors, Fas (CD95/TNFSFR6) is found expressed in almost all normal and tumoral tissues. Its activation by its ligand (FasL) can induce both death and non-death signaling pathways inducing cell apoptosis but also secretion of pro-inflammatory cytokines, cell migration and proliferation (Dostert et al., 2019). Invalidation and mutations of the Fas/FasL system in animal models and in human pathologies mainly demonstrate that Fas regulates tissue homeostasis in the immune system through the induction of both pro-apoptotic and non-apoptotic signalings (Rossin et al., 2019).

The pro-death role of Fas depends on the rapid recruitment to its cytoplasmic death domain of the adaptor protein FADD and the initiator caspases-8 and -10, which leads to the auto activation of these caspases. Depending on the cell types, initiator caspases lead to executioner caspases (-3, -6, -7) activation either directly or through an additional mitochondrial amplification loop that involves the cleavage of the Bcl-2 family protein Bid by caspase-8 leading to caspase-9 activation. Once activated, executioner caspases coordinate their activities to demolish key structural proteins which end up to cell destruction (Peter et al., 2007). Activated Fas is also able to recruit different signaling modulators, which may not automatically leads to caspase-8/10 activation and regulates non-apoptotic signaling pathways (Cullen et al., 2013).

Our previous study demonstrate that the C-terminal PDZ-binding site of Fas could recruit various exosomal markers including HSP70 and Syntenin-1. Since Syntenin-1 is a PDZ domain containing protein that promotes ILV formation at the surface of MVB by complexing with the auxiliary ESCRT component Alix (Baietti et al., 2012), our data suggest that Fas may be incorporated in exosome-like vesicles. Considering the important role of EV in various physiological and pathological situations, we addressed in this study the possible involvement of Fas in the generation of EV, their mechanism of biogenesis and their specific content using an unbiased proteomic approach.

Results

Fas activation leads to the secretion of apoptotic EV

To analyze the EV formed following Fas activation, Hacat cells stably expressing FasWT were left untreated or treated with FasL (10 ng/ml + M2) during 16 hours in serum starved media. This concentration triggers an efficient apoptosis of Hacat-FasWT cells and only 40% (in average, n=3; see Table S1) of the cells were still alive and adhere to the tissue culture plate at the end of the treatment. Using a classical differential ultracentrifugation protocol, we analyzed EVs present in the conditioned media pelleted at low speed centrifugation (2,000 g and 10,000g) and at 100,000 g ultracentrifugation corresponding respectively to apoptotic bodies, microvesicles (MV) and small-EV (sEV). The sEV fraction contains exosome but also other sEV populations which may not correspond to secreted ILVs (Kowal et al., 2016). To detect possible EV secretion, the different pellets were analyzed by immunoblot for the presence of EV markers, Fas signaling complex and unrelated control proteins. As shown in Fig. 1A, FasL treatment strongly increases abundancy of several EV markers (CD9, LAMP1, HSP70, HSP90), which were found enriched in all types of EVs, suggesting that Fas activation leads to the production and secretion of Apoptotic bodies, Apo-MV and Apo-sEV.

The exosomal marker Syntenin-1 is only present in the exosomal fraction in resting condition and is also strikingly increased after 16 hours of FasL treatment. As observed for Syntenin-1, the other exosomal component, the tetraspanin CD63, is mainly present in the exosomal fraction in basal condition and found highly enriched in this fraction after FasL treatment but also in much smaller proportion in Apo-MV (10,000g fraction) and apoptotic bodies (2,000g fraction).

Expression of unrelated control proteins were also analyzed which displays either no expression (Erk-2) or poor expression and enrichment in EV (E-cadherin and EGFR).

Interestingly, FasL treatment results in a strong increase of the presence of Fas in each fraction whereas it is barely detectable in various EV fraction collected in untreated condition. This suggest that Fas induces EV secretion but is also expressed at the surface of these EV. Since Fas is found strongly enriched in all apoptotic-derived EV fractions, we tried to detect Fas associated molecules known to participate either to pro-death Fas signaling (FADD, caspase-8) or non-death Fas signaling (TRAF2). TRAF2 and cleaved-fragments of caspase-8 (p43/41 and p18) formed after caspase activation were found in all types of apoptotic-EV following Fas activation. Intriguingly, FADD, the major cytosolic adaptor of Fas required to induce death-complex formation, failed to be identified in EV extracts.

Analysis of the sEV fraction by Transmission Electron Microscopy (TEM) showed cup-shaped vesicles (Fig. 1B) that are morphologically similar to typical exosomes and demonstrates that the majority of vesicles has a size of between 40 and 100 nm in diameter (Fig. 1B).

To further identify sEV fraction content, vesicles present in this fraction were separated by velocity iodixanol gradient (Fig 1C). Fas is found in only one type of floating vesicles which is enriched in

the exosomal marker Syntenin-1, and the other EV makers, HSC70 and Flotilin-1, suggesting that these sEV can be considered as Fas-positive Apo-Exo that we called Fas+Apo-Exo.

We verified that stimulation of Fas in Hacat parental cells that express endogenous Fas level could also lead to Fas+Apo-EV secretion by treating in parallel Hacat parental cells or stably expressing Fas-WT with higher and lower dose of FasL, respectively (Fig. 1D). Immunoblot on extracts from both Apo-MV and Apo-Exo revealed that Fas receptor together with the EV markers (Syntenin-1, CD63, CD9, HSP90 and HSP70) are found in parental Hacat stimulated with FasL at a concentration triggering a strong apoptotic signal (56% of surviving cells after 16 hours; Table S1). Presence of Fas and EV markers in Apo-EV is strongly increased in Hacat-FasWT, which correlates with the level of Fas expression and cell death rate (22% of surviving cells; Table S1) observed in these cells. Interestingly, we could notice that Fas, Syntenin-1, CD63 and CD9 can be detected in Apo-Exo even in absence of FasL stimulation, suggesting that Fas overexpression could lead to a basal Fas activity leading to Apo-EV formation.

Altogether these data suggest that Fas activation by its ligand leads to a strong secretion of EV of different sizes, including exosome-like vesicle, which express Fas at their surface.

Figure 1

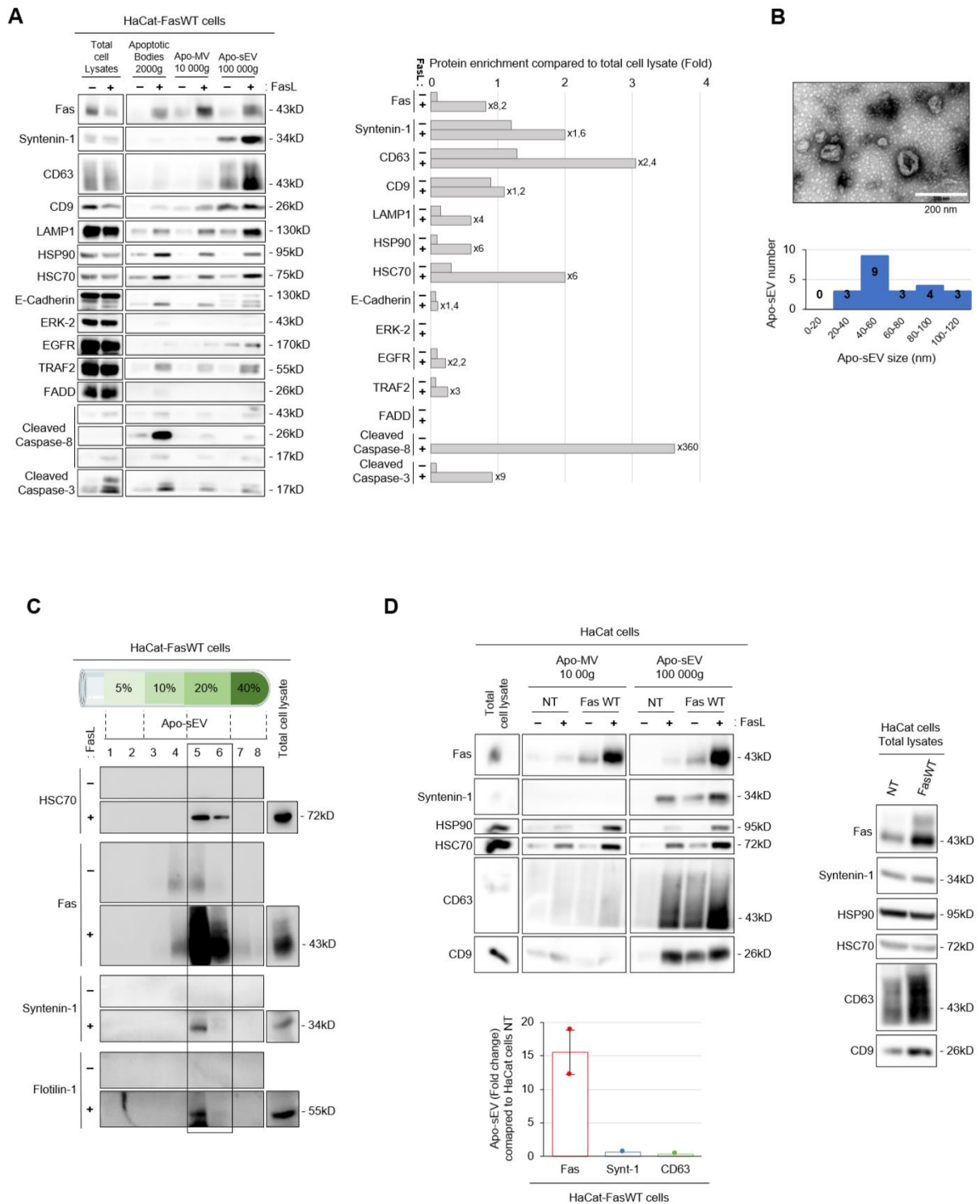


Figure 1 : Fas-mediated apoptosis induces different types of apoptotic EV.

(A) EV from Hacat stably expressing FasWT (Hacat-FasWT) grown in serum depleted media in absence or presence of FasL for 16 hours were collected using a serial centrifugation protocol at 2000g, 10,000g and 100,000g, lysed and analyzed by immunoblot for detection of various proteins. Enrichment of each protein in each EV fractions were measured by quantitative densitometry and compare to total cell lysate. (B) Transmission electron microscopy was used to visualize sEV and calculate their size. Histograms represents the size distribution of sEV measured by ImageJ software. (C) Separation of sEV pellet on iodixanol gradient analyzed by immunoblots compared the distribution of Fas and known EV markers. (D) Immunoblot analysis of sEV pellets recovered from conditioned media of Hacat parental cells or of Hacat-FasWT treated or not with 15ng/ml or 10ng/ml of FasL+M2 respectively. Presence of Fas, Syntenin-1 (Synt-1) and CD63 in sEV of parental and FasWT expressing cells were measured by quantitative densitometry. Fas and EV markers expression levels were analyzed in total cell lysates from Hacat and Hacat-FasWT by immunoblot.

Caspases inhibition strongly affects Fas-Apo-Exosomes secretion

Many reports demonstrated the key role of caspases in the process of EV formation during apoptosis. In particular, Apo-exosome-like vesicles formation has been associated with caspase-3 activation (Park et al., 2018; Sirois et al., 2011) whereas other secretory process has been shown to involve other caspases such as caspase-8 (Kim et al., 2017). Thus, we tested the impact of caspases inhibition on Fas-dependent EV release by using both pharmacological inhibitors and loss of function approach using siRNA directed against individual caspases.

Secretion of EVs were analyzed in HacaT-FasWT treated or not with FasL during 16 hours in absence or presence of various caspase inhibitors: a pan-caspases inhibitor (z-VAD-fmk), or inhibitors of initiator caspase-8 and caspase-10 (z-IETD-fmk and z-AEVD-fmk, respectively). Treatment with z-VAD-fmk efficiently block caspases activation (Fig. S1A), Fas-induced apoptosis (95% of surviving cells; Table S1) and completely inhibit secretion of both Apo-MV and Apo-Exo as demonstrated by immunoblot of EV extracts (Fig. 2A). Moreover, z-VAD-fmk treatment reduces also the basal secretion of exosomes observed in absence of FasL treatment since presence of exosomal markers (CD63, CD9 and Syntenin-1) is strongly diminished. This confirms that the increased basal secretion of exosomes in cells stably expressing FasWT (HacaT-FasWT) is due to spontaneous activation of pro-apoptotic Fas signaling. Caspase-8 and -10 inhibitors block efficiently caspases activation (Fig. S1B and C), pro-apoptotic Fas signaling (82% and 63% of survival cells, respectively; Table S1) and Apo-MV secreted following Fas activation (Fig. 2B and C). Although, caspase-10 inhibitor is less potent than caspase-8 inhibitor in blocking these effects. Surprisingly, caspase-8 and 10 inhibition results in an increase of the EV markers (CD63, CD9, Syntenin-1) detected by immunoblot in sEV extracts in absence of FasL treatment. Addition of FasL fails to increase the abundancy of these markers in the sEV fraction. However, caspase-8 inhibitor strongly reduces Fas accumulation in the sEV extracts whereas caspase-10 inhibitor has only a modest effect.

Altogether these results demonstrate that, Fas-Apo-MV formation/secretion requires apoptotic cell death in order to be efficiently produced and is totally blocked or strongly decrease by z-VAD-fmk or caspase-8 and -10 inhibitors respectively. Following Fas activation, Apo-Exo formation/secretion requires caspases activation and initiator caspase-8 facilitate Fas routing in these EV and result in an increase exosome secretion rather than an inhibition.

Since caspases are required for Fas-Apo-Exo secretion following Fas activation and some studies demonstrate the major role of caspase-3 in Apo-exosome secretion, we analyzed the possible involvement of each individual caspases activated below caspase-8/10 using a loss of function approach by transfecting siRNA. Secretion of sEV were analyzed by immunoblot in HacaT-FasWt transfected by siRNA targeting caspase-3, -6, -7 or -9 and the survival rate were calculated following 16 hours of Fas activation (Fig. 2D). Each siRNA was validated by analyzing their capacity to block expression or activation of each individual caspase following FasL treatment (Fig. S1D). Analysis of the survival rate in cells transfected with the various caspase

siRNA revealed that the knockdown of caspase-9 and -6 protects partially from FasL-mediated apoptosis (see Table S1). Cells knockdown for caspase-3 and -7 have a similar survival rate than cells transfected with a control siRNA, suggesting that inhibition of caspase-3 or -7 is not sufficient to protect cells from apoptosis. Analysis by immunoblot of sEV fractions demonstrate that all the tested caspases affect Fas enrichment following FasL treatment with a more striking effect in cells transfected with caspase-7 siRNA. Interestingly, cells targeted for caspase-9 expression display an increase in the presence of Syntenin-1 and CD63 even in non-stimulated cells as it was observed with caspase-8 and 10 inhibitors.

Our results demonstrate that caspase-3 and -7 activation promotes Fas+Apo-Exo formation/secretion but that none of the tested caspases (-3, -6, -7, -9) is essential *per se*. This suggests that the proteolytic caspase activity required for this function overlaps between several caspases.

Figure 2

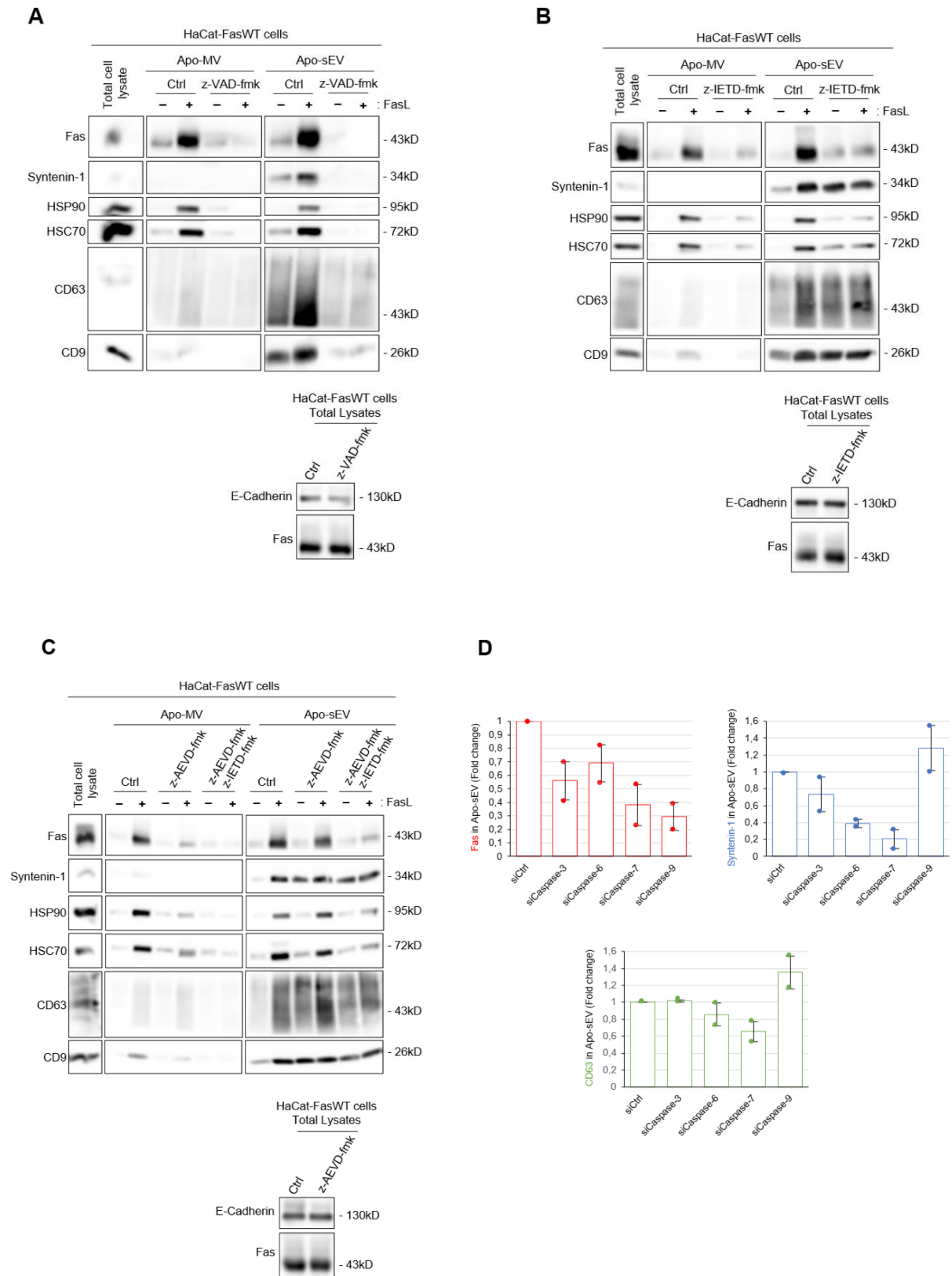


Figure 2 : Caspases regulate EV secretion and presence of Fas in sEV.

(**A-C**) sEV fractions were prepared from Hacat-FasWT cells left untreated (Ctrl) or treated with a broad caspases inhibitor (z-VAD-fmk) (**A**), caspase-8 (z-IETD-fmk) (**B**) or caspase-10 (z-AEVD-fmk) (**C**) alone or in combination. Equal amount of each fraction was analysed by immunoblot. Immunoblots of total lysates were used to compare Fas expression in control or the different treated conditions. (**D**) Presence of Fas, Syntenin-1 and CD63 were analyzed by immunoblot in sEV fractions from Hacat-FasWT cells transfected with control siRNA (siCtrl) or siRNAs targeting different caspases (caspase-3, -6, -7 or -9). Relative presence of Fas, Syntenin-1 and CD63 in caspase knockdown and control cells was quantified by densitometry.

Syntenin-1 regulates Fas+Apo-Exo secretion but is not absolutely required for this process

Our recent proteomic analysis reveals that Fas C-terminal PDZ-binding site can interact with 53 different proteins, including 19 PDZ domain containing proteins (Gagnoux-Palacios et al., 2018). Three of these molecular partners are known EV components including Syntenin-1, HSP70 and HSC70. Considering the importance of Syntenin-1 in exosome formation, we investigated the significance of Fas/Syntenin-1 interaction in the formation/secretion of EV following Fas activation. Using peptide pull-down experiments, we confirmed that Syntenin-1 and HSP70 interact with WT Fas C-terminal domain but not with a mutated peptide deleted of the three last amino acids (SLV), which compose Fas class I PDZ-binding motif (Fig. 3A).

To analyze the role of Fas-PDZ binding site and Syntenin-1 recruitment on sEV secretion, we generated Hacat stably expressing FasWT (Hacat-FasWt) or Fas Δ SLV mutant (Hacat- Fas Δ SLV) and Syntenin-1 or an empty vector. Indeed, Syntenin-1 overexpression has been shown to promote exosomal secretion (Baietti et al., 2012). First, we compared sEV content of Hacat-FasWt to Hacat-Fas Δ SLV expressing an empty vector (Hacat-FasWt-Ctrl and Hacat-Fas Δ SLV-Ctrl). Total lysates analysis from these two cell lines revealed that FasWT is more expressed than Fas Δ SLV mutant which is in agreement with our previous data demonstrating the role of the PDZ-binding site of Fas in its plasma membrane stabilization (Fig. S2A) (Gagnoux-Palacios et al., 2018). Immunoblot on sEV extracts followed by quantification analysis demonstrated that Fas Δ SLV mutant is less present in the sEV fraction compared to the wild type counterpart (Fig. 3B and C), suggesting that this domain plays a role in the targeting of Fas into exosomes.

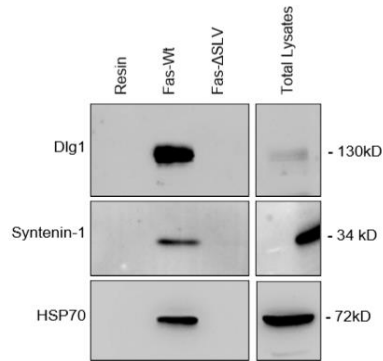
We then analyzed the consequence of modulation of Syntenin-1 expression on Fas-dependent sEV secretion by using either loss of function or gain of function experiments. Total extracts analysis revealed that Syntenin-1 overexpression significantly increases both WT and Δ SLV mutant compared to parental cells expressing the empty vector (Fig. S2A). Then, sEV content were analyzed in these cell lines in presence or absence of FasL treatment (Fig. 3B). Immunoblots followed by quantification analysis showed that Syntenin-1 overexpressing cells promotes both CD63 and Fas accumulation in FasL treated and untreated cells compare to FasWt or Fas Δ SLV Hacat cells expressing an empty vector (Fig. 3B, D and E). These data suggest that Syntenin-1 increase both stability and sEV-targeting of Fas, at least in part, independently of Fas-PDZ binding motif.

Effect of Syntenin-1 on sEV content was then analyzed in Syntenin-1 knockdown cells. Immunoblot of sEV extracts from HacatFasWT cells transfected with control (siCtrl) or Syntenin-1 (siSynt-1) siRNAs treated or not with FasL revealed that Syntenin-1 knockdown does not block the presence of Fas and other EV-markers including CD63, CD9, HSP90 and HSC70 (Fig. 3F).

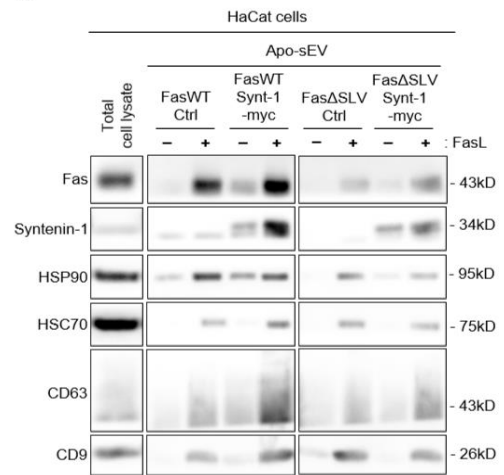
Altogether these results suggest that Syntenin-1 is a not essential to the formation and/or secretion of sEV secreted following Fas activation but its presence facilitate Fas+Apo-Exo formation/secretion.

Figure 3

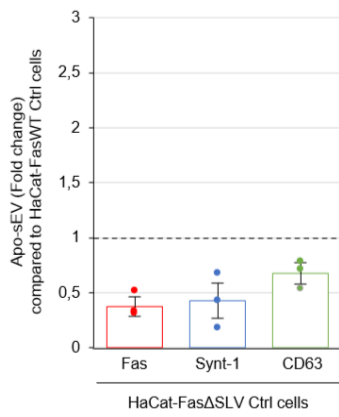
A



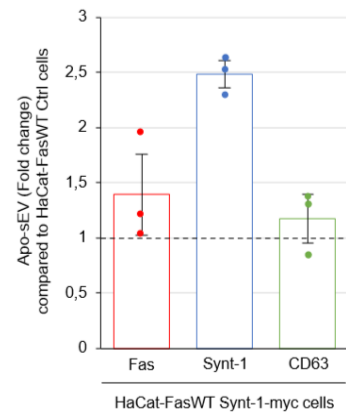
B



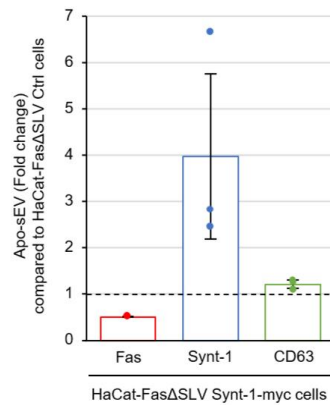
C



D



E



F

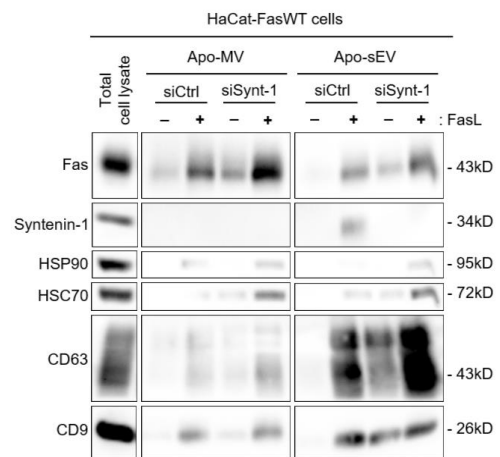


Figure 3 : Syntenin-1 is dispensable for Fas dependent sEV formation.

(A) Immunoblot after pull-down assay on Hacat-FasWT cell extracts using resin alone or coupled to the C-terminal peptide of Fas WT or mutant deleted of the 3 last amino acids (Fas Δ SLV). (B) Immunoblot analysis of sEV pellets recovered from conditioned media of different Hacat derived cells (Hacat stably expressing FasWT (Hacat-FasWt) or Fas Δ SLV mutant (Hacat-Fas Δ SLV) and Syntenin-1 (Synt1-myc) or an empty vector (Ctrl)) treated or not with 10ng/ml of FasL+M2. (C-D) Presence of Fas, Syntenin-1 (Synt-1) and CD63 in sEV were compared between Hacat-FasWT-Ctrl and Hacat-Fas Δ SLV-Ctrl (C), Hacat-FasWT-Ctrl and Hacat-FasWT-Synt-1-myc (D), and Hacat-Fas Δ SLV-Ctrl and Hacat-Fas Δ SLV-Synt-1-myc (E). Relative presence of each protein was evaluated by quantitative densitometry on immunoblots (n=3) and data represent the fold change between the different conditions as mentioned in each graph. In all graphs, the bars represent means \pm s.e.m. (F) Apo-EV content from Hacat-FasWT cells transfected with control (siCtrl) or Syntenin-1 (siSynt-1) siRNAs and treated or not with FasL/M2 for 16 hours were analyzed by immunoblot.

Fas+Apo-Exo are produced through the endosomal pathway and their formation is dependent of Alix

To determine the possible involvement of the endosomal trafficking of Fas in the biogenesis of Fas+ Apo-Exo, we first investigated by immunofluorescence the fate of internalized Fas following FasL treatment. In absence of FasL stimulation Fas receptor is almost completely localized at the cell surface, whereas FasL stimulation triggers the detection of Fas+ endosomal vesicles that partially co-localized with the early endosome marker EEA1 (early endosomal antigen 1) after 30 min of stimulation and is maintained for up to 2 hours of treatment (Fig. 4A). Co-localization of Fas with the late endosomal marker and exosome component CD63 is delayed compared to EEA1 and peak around 2 hours (Fig. 4B). Thus, following activation Fas is rapidly internalized and traffics along the endosomal system to reach the CD63 late endosome where is possibly included in ILV.

Then, we tried to block ILV formation by interfering with known processes. At the surface of late endosomal compartment, ILV can occur through both ESCRT dependent and independent mechanisms. Apo-Exo formation has been suggested to rely on the constitutive activation of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors (S1PR) at the surface of MVB, which allows cargo sorting in ILV (Kajimoto et al., 2013; Park et al., 2018). Since S1P dependent activation of S1P receptors (S1PR1, 2 and 3) serve in cargo sorting in exosomes, we investigated whether inhibition of S1PR signaling blocks sEV formation following Fas activation. sEV fractions were prepared from Hecat-FasWt cells co-treated with FasL and S1PR inhibitors, Siponimod, JTE013, and CAY10444, which are inhibitors of S1PR1, 2 and 3, respectively. sEV content analysis by immunoblot (Fig. 4C) revealed that none of these treatments alone or in combination affect the release of Apo-Exo components including Fas and Syntenin-1, suggesting that S1PR pathway is not critical in the biogenesis of Fas dependent apoptotic EV.

Since the ESCRT accessory molecule Alix forms a complex with Syndecan-1 and Syntenin-1 to induce ILV formation at the surface of MVB (Baietti et al., 2012), we tested the possible involvement of Alix in ILV formation following Fas activation. Even though we demonstrate that Fas-Syntenin-1 interaction is not absolutely required for Fas dependent Apo-Exo biogenesis, we cannot exclude that Alix may be recruited to Fas by another molecular mechanism. Loss of function assay using a siRNA directed against Alix demonstrate that siRNA silencing of Alix strongly affects the presence of both Fas and Syntenin-1 within the sEV fraction without modifying the release of apoptotic microvesicles and the pro-apoptotic signaling of Fas (Fig. 4D and Fig. S3 A and B). This result suggests that Alix is involved in the formation of ILV and release of Apo-Exosomes following Fas induced apoptosis but not for apoptotic microvesicles known to form at the plasma membrane by a different molecular process.

Figure 4

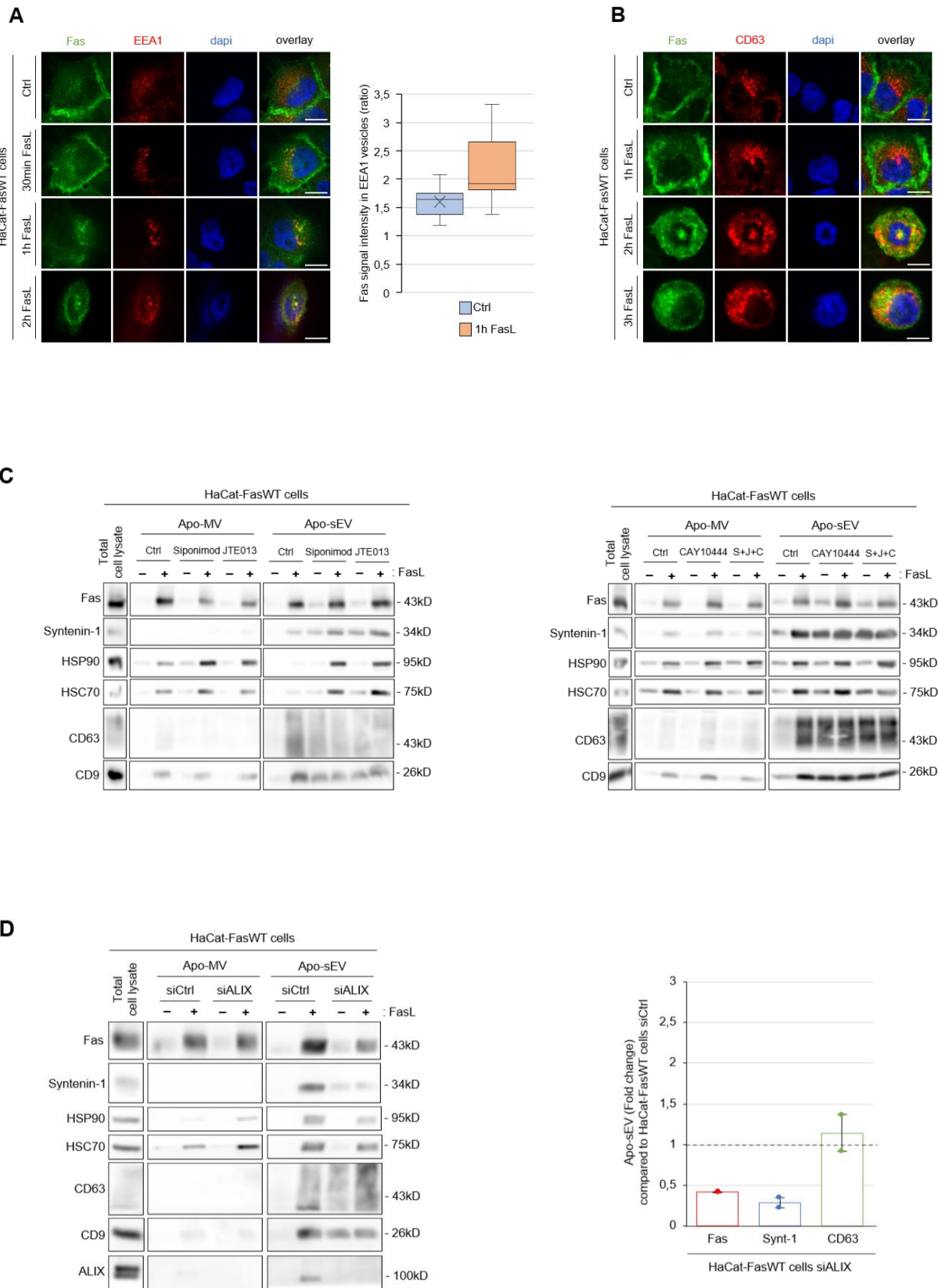


Figure 4 : Fas+Apo-Exo biogenesis is dependent of Alix.

(A-B) Immunofluorescence analyses of co-localization between Fas (Green) and the early (EEA1) or late (CD63) endosomal markers (Red) were done on HacaT-FasWT cells in absence (Ctrl) or after FasL addition at different time points. Quantification of co-localization between Fas and EEA1 was done after 1 hour on at least 5 cells as explained in Material and Method section. **(C)** sEV fractions were prepared from HacaT-FasWT cells left untreated (Ctrl) or treated with S1PR specific inhibitors alone or in combination. Siponimod, JTE013, and CAY10444 are pharmacologic antagonists of S1PR1, S1PR2 and S1PR3 respectively. Equal proportion of each fraction were analysed by immunoblot. **(D)** Apo-EV content from HacaT-FasWT cells transfected with control (siCtrl) or Alix (siAlix) siRNAs and treated or not with 10ng/ml FasL+M2 for 16 hours were analyzed by immunoblot. Relative presence of each protein was evaluated by quantitative densitometry on immunoblots (n=2).

Fas+Apo-Exo are enriched in immune regulatory receptors

In order to propose a specific function to the Apo-Exo secreted following Fas activation and to identify specific biomarkers, we analyzed their composition using an unbiased proteomic approach. Purified EV of FasL-treated cells and untreated cells recovered at 100,000 g ultracentrifugation (100K pellet) were subjected to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). 2,439 proteins were significantly detected in four biological replicates of FasL exosomal fractions. Among these proteins, 2,384 were upregulated and 55 downregulated compared to the untreated exosomal fraction. 1,409 proteins were only detected in FasL treated condition (Fig. 5A). As expected, 62 of the 100 most represented exosomal protein annotated in the ExoCarta repository were identified in our analysis including Alix (also known as PDCD6IP), Syntenin-1, the tetraspanins CD9, CD63, CD81, flotillin-1 and 2, HSP70, HSP90 (also known as HSP90AA1 and HSP90AB1) and TSG101 (Table S2 and Fig. 5B), thus validating our technical approach and the presence of true exosomes in our sEV fractions.

Importantly, our analysis confirmed the strong enrichment of Fas in the Apo-Exo fractions compare to the untreated control cells (Fig. 5C). Surprisingly, only few proteins known to interact and/or participate to Fas signaling were identified including the TNF receptor associated factor protein-2 (TRAF2), the kinase TAB1, the FAS-associated factor 1 (FAF1), the E3 ubiquitin ligase ITCH, and the cytosolic adaptor TRIP6 (Fig. 5C). We were not able to detect important death complex associated proteins such as FADD and caspases. Lack of detection of caspases could be explained by the abnormal peptide profile in MS/MS due to their proteolytic cleavage during their activation process since they are detected by immunoblot (Fig. 1A).

We focused our interest on the surface receptors present on sEV since interaction of exosomes with target cells has been shown to be driven by surface molecules (Hoshino et al., 2015; van Niel et al., 2018). 266 transmembrane proteins have been identified to be significantly upregulated in sEV fraction upon FasL stimulation including receptor tyrosine kinase, adhesion molecules (integrins, cadherins and claudins), ion channels (Table S3).

Since the Fas/FasL system is an important modulator of the immune system, we hypothesized that Fas expressing exosomes may play an immunomodulatory function by targeting FasL expressing immune cells. In agreement with this hypothesis, we found that sEV fractions are specifically enriched in surface receptors known to be immune interacting markers such as MHC-I, CD70 (CD27 Ligand), CD47, ICAM-1 and CAR (Coxsackievirus and adenovirus receptor) (Fig. 5C). If MCH-I molecules are responsible of antigen presentation, CD70, CD47, ICAM-1 and CAR are known to interact with their molecular partners (CD27, SIRP α and γ , LFA-1, and JAML, respectively) located on immune cells, including T-lymphocytes, neutrophils and macrophages, and modulate their fate. These receptors and their ligands are involved in different important aspects of the immune response such as: promoting co-stimulation at the immunological synapse formed between cytotoxic T or NK cell and cancer cell (LFA-1/ICAM-1 (Anikeeva et al., 2005), CD47-SIRP γ (Piccio et al., 2005)); inducing proliferation of unconventional $\gamma\delta$ T cells present in

peripheral bloods and epithelia such as skin, which confer a rapid response to invading pathogens and presence of malignant cells (JAML/CAR (Witherden et al., 2010)); being an immune checkpoints that trigger a “don’t eat me” signal for phagocytes, including macrophages and neutrophils, which block phagocytic function (CD47/SIRP α (Logtenberg et al., 2020)).

Interestingly, ICAM-1 and CD47 are known to be strongly induced by TNF α and to be overexpressed in inflammatory conditions through activation of the NF- κ B pathway (Dustin and Springer, 1988; Huang et al., 2020). Since Fas non-death signaling leads to induction of a transcriptional response through induction of MAPK and NF- κ B pathways, we analyzed the expression of these receptors following FasL treatment in presence of the broad-spectrum caspase inhibitor z-ZVAD-fmk, which is known to block apoptosis and promote Fas non-death signaling, or TNF α , as a potent pro-inflammatory cytokine. Immunoblots demonstrate that FasL activation strongly increase the expression of CD47, CD70, and ICAM-1 but has only a minor effect on HLA-I and CAR (Fig. 5D). Similar observations were made following TNF α treatment expect that TNF α is a much more potent inducer of CD47, CD70, ICAM-1 than FasL and it results in a strong inhibition of CAR expression, probably due to the regulatory role of TNF α on cell-cell junction (Vincent et al., 2004).

We then tested the possibility that Fas activation could promote the routing of all or part of these receptors at the surface of sEV and increase their presence in Fas+Apo-Exo. Since we observed that Fas accumulation in Apo-Exo is either inhibited in caspase-8 specific inhibitor (z-IETD-fmk) treated cells or increased in FasWT overexpressing cells, we analyzed by immunoblot the sEV content in these two conditions (Fig. 5E and F). Immunoblots confirmed that these receptors could be detected in both total cell lysates and sEV fraction (Fig. 5E and F). Moreover, these experiments clearly demonstrate that HLA-I, CD70, CD47, ICAM-1 and CAR are strongly decreased following z-IETD-fmk treatment whereas FasWT overexpression clearly increase HLA-I, CD47, ICAM-1 and has no effect on CD70 on sEV accumulation (Fig. 5F). These observations demonstrate a clear correlation between the presence of Fas in Apo-Exo and these immune related receptors. We also proved that a 24 hours pre-treatment of TNF α before sEV extracts preparation either in FasL treated or control untreated cells result in a strong increase of the presence of HLA-I, CD70, CD47, ICAM-1 and a decrease of CAR as assessed by immunoblot (Fig. 5F).

We then try to determine if Fas could be found associated in the same molecular complex with one or several of these receptors at the plasma membrane or in endosomes. The molecular association of Fas with CD47 has been previously described and promotes the pro-apoptotic signaling of Fas (Manna et al., 2005). To further analyze this association, Fas co-localization with CD70, CD47 or ICAM-1 were analyzed by immunofluorescence in Hacat-FasWT incubated for 1 hour with FasL coated beads, to trigger Fas surface aggregation. Indeed, we previously shown that Fas accumulate with time underneath the FasL-coated beads together with DISC components such as caspase-8 (Gagnoux-Palacios et al., 2018). This experiment has been

conducted either in absence or in presence of 24 hours TNF α pre-treatment in order to increase expression of these molecules. Immunofluorescence demonstrate that Fas and CD47 accumulate underneath FasL coated beads in both control and TNF α pre-treated conditions whereas presence of CD70 is observed only when cells are pre-treated with TNF α (Fig. 5G). In contrast, ICAM-1 failed to be detected underneath FasL coated-beads but it accumulates at the periphery of the beads, suggesting an indirect recruitment of ICAM-1 around Fas aggregates. Our results suggest that Fas activation leads to its co-aggregation together with other cell surface receptors among with CD47 and CD70, which are found associated with Fas in Apo-Exo.

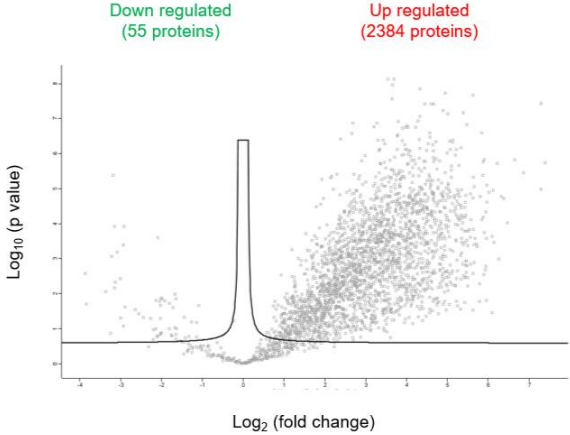
To further determine if these surface receptors may co-traffic with Fas along the endo-lysosomal system resulting in their presence in Fas+Apo-Exo, we performed immunofluorescence analysis to localize Fas and CD47 before and after FasL treatment to trigger activated Fas receptor endocytosis. Immunofluorescence analysis revealed a partial co-localization of Fas and CD47 in some endosomal vesicles following FasL treatment, suggesting a co-endocytosis of these molecules (Fig. 5H). We proved also that CD47 is found enriched in EEA1 endosomal compartment following FasL treatment, confirming that Fas activation is sufficient to trigger CD47 endocytosis (Fig. 5I).

Altogether our data suggest that various immune regulatory molecules present at the surface of Hacat cells are found in Fas+Apo-Exo induced in FasL-mediated apoptosis. Localization of these receptors in Apo-Exo is promoted by the presence of Fas in these EV and increased in pro-inflammatory conditions. This suggest that Fas+Apo-EV surface repertoire confers to these EV a capacity to target immune cells and have an-immunomodulatory function.

Mechanistically, our experiments suggest that at least some of these receptors, including CD47 and CD70, co-aggregate with Fas-signaling complex at the plasma membrane and co-traffic within the endosomal system allowing their expression together with Fas in Fas+Apo-Exo.

Figure 5

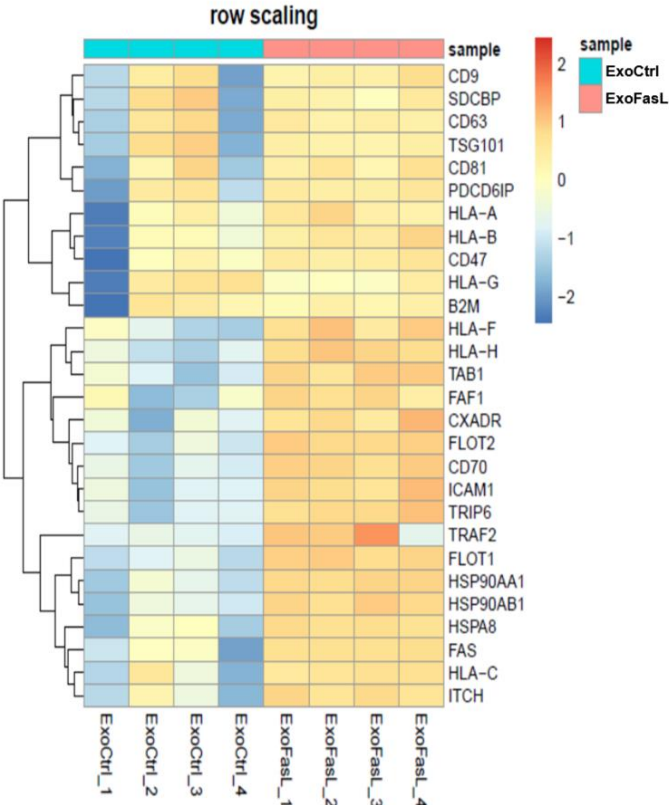
A



B



C



D

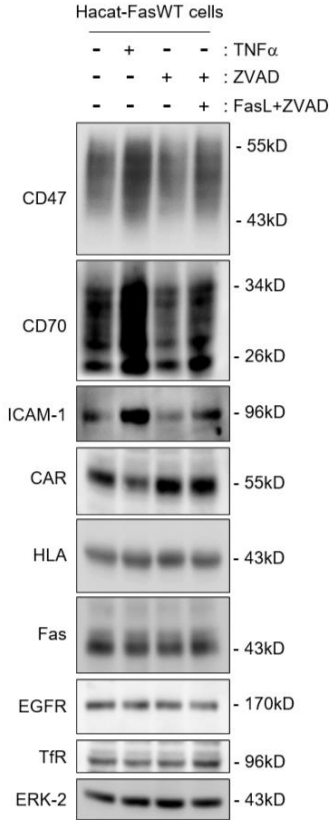
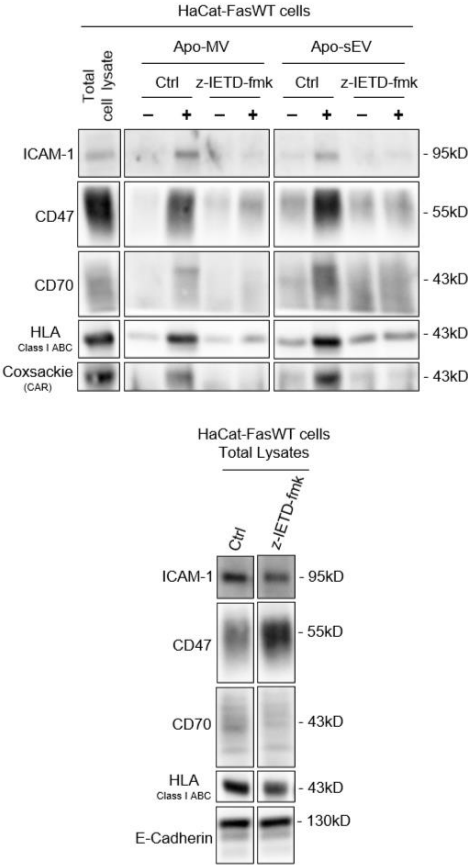
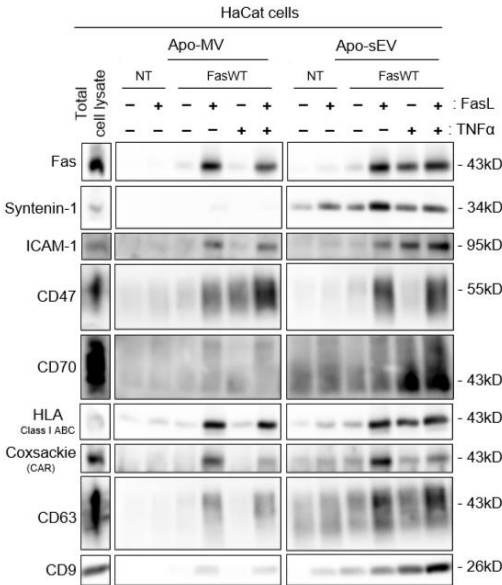


Figure 5 (2nd part)

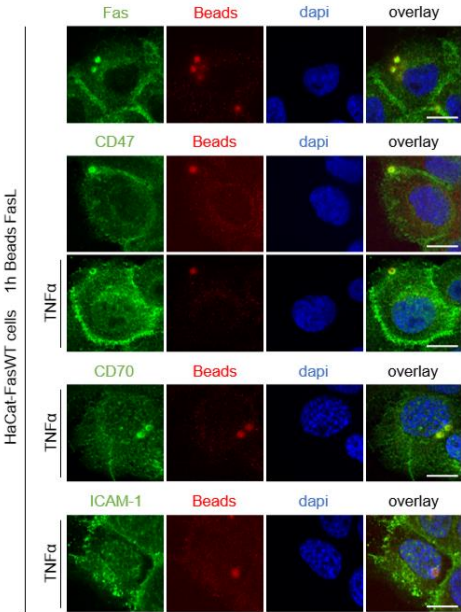
E



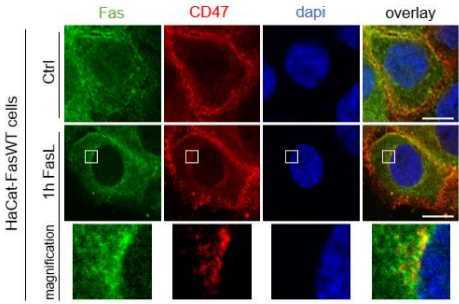
F



G



H



I

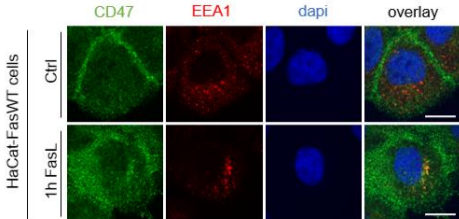


Figure 5 (3rd part)

J

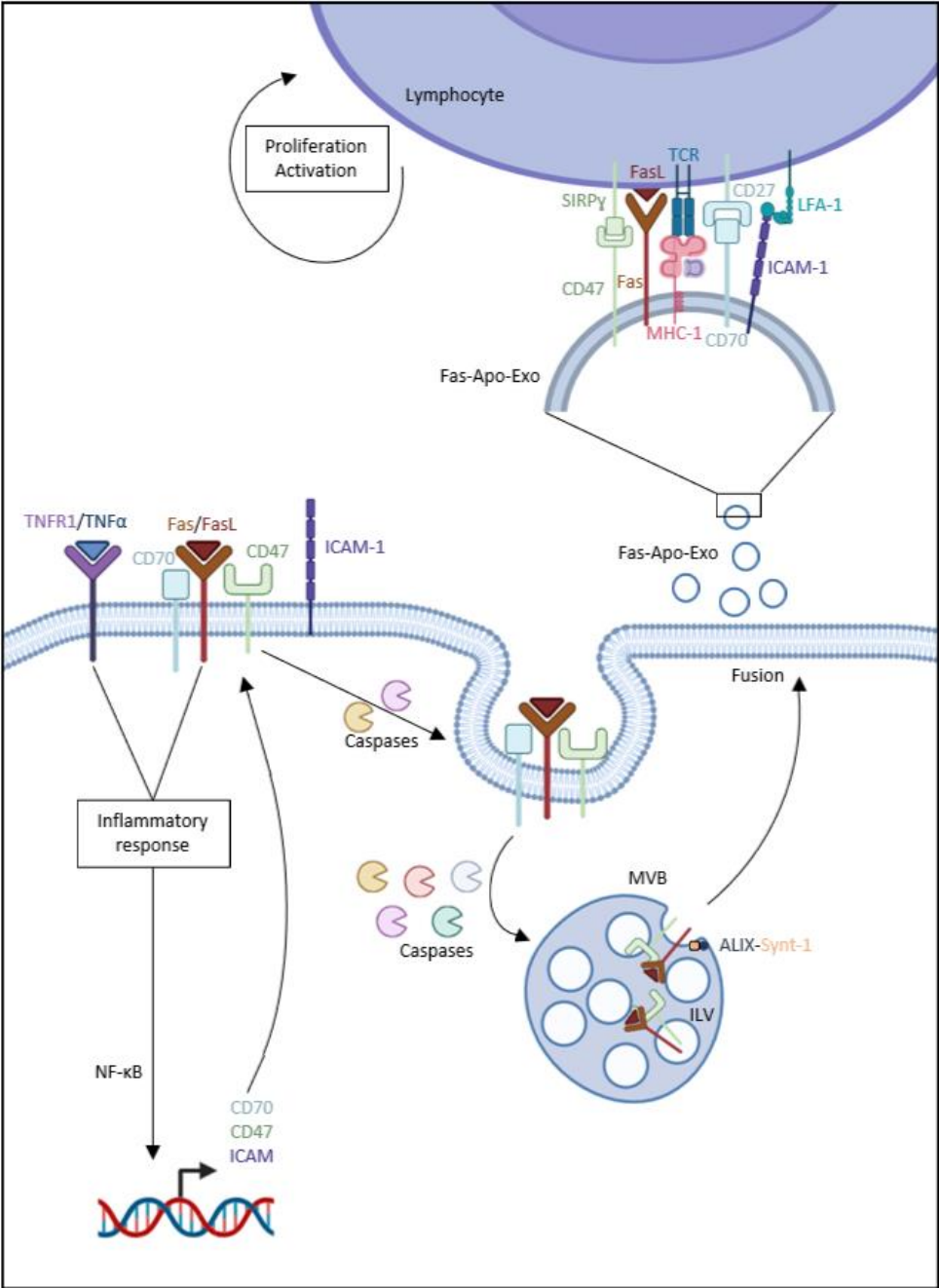


Figure 5 : Proteomic analysis of Fas dependent Apo-Exo revealed the presence of immune related receptors on these EV.

(A) Volcano plot summarizing comparison between the proteins detected in sEV fraction of Hacat-FasWT treated with FasL+M2 during 16 hours. The log₂ ratio of protein intensities was plotted against negative log₁₀p-values. Data represent the individual protein identified in 4 biological replicates by nLC-MS-MS. (B) The overlap between proteins in Fas dependent sEV and the human proteins annotated in ExoCarta repository. (C) Heat map displaying selected proteins that were upregulated (red) or downregulated (blue) after MS/MS analysis of sEV extracts from Hacat-FasWT cells left untreated (ExoCtrl) or treated with FasL+M2 (ExoFasL). (D) Analysis of proteins in total cell lysates of Hacat-FasWT treated 24 hours with TNF α (10ng/ml), FasL/M2+z-VAD-fmk (20ng/ml+M2 and 10 μ M respectively), z-VAD-fmk (10 μ m) or left untreated were done by immunoblots. (E) sEV fractions were prepared from Hacat-FasWT cells left untreated (Ctrl) or treated with caspase-8 inhibitor (z-IETD-fmk) and equal amount of each fraction were analysed by immunoblot. Immunoblots of total lysates were used to compare expression of each protein. E-cadherin was used as a loading control. (F) Impact of TNF α on EV content was analyzed by immunoblot on sEV pellets recovered from conditioned media of Hacat parental cells (NT) or Hacat-FasWT (FasWT) treated or not with 15ng/ml or 10ng/ml of FasL+M2 and pre-treated or not during 24 hours with TNF α (10ng/ml). (G) Immunofluorescence were used to detect the localization of Fas, CD70 and ICAM-1 in Hacat-FasWT cells incubated with FasL-coated beads during 1 hour. In some experiments, cells were pre-treated 24 hours with TNF α (10ng/ml). Beads appear in red by autofluorescence. (H) Co-localization of Fas and CD47 by immunofluorescence in Hacat-FasWT cells left untreated (Ctrl) or treated 1 hour with FasL (10ng/ml). An enlarged part of images is shown. (I) Co-localization of CD47 and EEA1 by immunofluorescence in Hacat-FasWT cells left untreated (Ctrl) or treated 1 hour with FasL (10ng/ml). (J) Proposed model of Fas dependent EV biogenesis, composition and function.

Discussion

In an attempt to link the apoptotic signaling of death receptors with the secretion of EV, we show that Fas activation triggers secretion of various types of apoptotic EV including Apoptotic bodies, microvesicles (Apo-MV) and exosomes like vesicles, also called here Apoptotic-Exosomes (Apo-Exo). We demonstrate that both Apo-MV and Apo-Exo express Fas receptor at their surface. Focusing our interest on Apo-Exo secreted following Fas activation, our work proposes a first description of the molecular events at the origin of their biogenesis as well as an unbiased analysis of their composition using a proteomic approach. At the early phase, Fas activation triggers Fas receptor co-aggregation with other transmembrane receptors, which are endocytocized and concentrate with time in early endosome and then in late endosome. Once in late endosome Fas receptor macrocomplex is incorporated into ILV through an Alix/Syntenin-1 dependent mechanism, which involves C-terminal Fas PDZ-binding site. Fas+ MVB possibly fuse with the plasma membrane by a caspase-dependent mechanism since inhibition of caspases blocks EV release. Caspases activation is essential to the release of Fas+ Apo-Exo but regulates also the presence of Fas in Apo-Exo, suggesting that caspases may regulate Fas intracellular routing (Fig. 5J).

Our study unravels part of the mechanisms underlying Fas+ Apo-Exo formation and in particular unravels the specific involvement of Alix. Since we proved that Fas and Syntenin-1 co-interact through the PDZ binding site of Fas, we were expecting that presence of Fas in Apo-Exo would be dependent of Syntenin-1. Unexpectedly, we were not able to prove an involvement of Syntenin-1 neither in Fas receptor Apo-Exo localization, trafficking nor signaling (not shown), whereas Fas+ Apo-Exo biogenesis requires Alix, the ESCRT accessory molecule that associates with Syntenin-1 to ensure ILV formation. Our data show that deletion of Fas-PDZ binding site affects the presence of Fas, Syntenin-1 and CD63, in sEV collected in cells stimulated by FasL. These results suggest that the PDZ binding site of Fas may interact with other PDZ scaffold proteins that could influence Apo-Exosomes formation and/or secretion and that this process is at least in part dependent of Alix protein. In agreement with these results, it is interesting to notice that a recent paper of the group of P. Zimmerman demonstrates that several PDZ domain containing protein can interact, like Syntenin-1, with Syndecans (-1 to 4) and tetraspanins (such as CD63) through their PDZ-binding sites and that absence of some of these proteins modulates EV number and composition (Castro-Cruz et al., 2023). Our proteomic analysis of sEV content identified 15 PDZ domain containing proteins and among them 8 proteins were previously found by us as potential Fas interactants (Gagnoux-Palacios et al., 2018), including Dlg1, CASK, MPP6, MPP7, ZO-1, β 2-syntrophin and Syntenin-1. Among these proteins, CASK and MPP6 are found by P Zimmerman group as newly SDCs molecular partners (Castro-Cruz et al., 2023). It would be of interest to test the capacity of these molecules to play a role in Fas+ Apo-exosomes formation and in the possible Alix-dependent ILV formation process. This would suggest that various PDZ molecules may compensate the absence of Syntenin-1 during exosome formation. This

hypothesis would explain why Syntenin-1 depletion do not modify sEV fraction content whereas knockdown of Alix strongly impacts it. In agreement with this theory, it has been shown that Alix has been found associated with tight junction complex together with ZO-1 (Campos et al., 2016). Since we previously demonstrate that Fas concentrates at cell-cell junction in colon carcinoma cells (Gagnoux-Palacios et al., 2018), it is possible that Fas may be internalized together with ZO-1 and Alix which further facilitate ILV formation once reaching the late endosomal compartment. Besides influencing ILV formation, Fas-PDZ proteins interaction may also modulate the recruitment of specific cargo molecules in exosomes and therefore influence their function. Further investigations will be required to evaluate the influence of Fas molecular partners containing PDZ-domain on Fas+ Apo-Exo content.

Finally, our study reveals that Fas+ Apo-Exo express at their surface various immune related receptors, including MHC-I, CD70, ICAM-1 and CD47, able to influence the behavior of various types of immune cells. In agreement with these observations, many studies clearly demonstrate that EV secreted by either tumor or immune cells can have an important immunoregulatory function by promoting antigen presentation or by activating or inhibiting the immune response (reviewed in (Greening et al., 2015)). Since Fas/FasL system is crucial in immune cells homeostasis, it is tempting to hypothesize that Fas derived EV could regulate some immune related processes. Expression of MHC-peptide complex at the surface of exosomes has been shown to allow the antigen presentation to both naive and cytotoxic T lymphocytes, leading to T cell activation and initiation of an adaptive anti-tumoral immune response (Zitvogel et al., 1998). Fas+ Apo-Exo express CD70 and ICAM-1 which possess co-stimulatory functions at the immunological synapse. Indeed, naive lymphocytes require both engagement with antigen receptors and signals from additional receptors for optimal activation, proliferation, and differentiation. CD70, is the natural ligand of CD27, another member of the tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) which is only transiently expressed on activated immune cells, including T and B cells, dendritic cells (DCs) and NK cells (Wajant, 2016). The co-stimulatory T cell signal generated via CD27 activation by CD70 enhances T cell division and survival and has emerged as an interesting immunotherapy target in the treatment of cancer (Wajant, 2016). The interaction of ICAM-1 with the integrin α L β 2 (also called LFA-1 for lymphocyte function-associated antigen-1) is also known to participate to the initiation and the stabilization of the immunological synapse that forms between the cytotoxic T or NK cell and ICAM-1 expressing cancer cells in order to trigger a cytolytic response (Anikeeva et al., 2005). Predicting the role of CD47 at the surface of EV is more difficult since this pleiotropic receptor is ubiquitously expressed and interacts with different ligands, which modulate both innate and adaptive immune systems. CD47 interacts with two members of the signal-regulatory protein (SIRP) family, SIRP α and SIRP γ . Within the immune system, SIRP α is expressed in all myeloid cells, dendritic cells and NK cells. CD47-SIRP α interaction triggers a signal of self and a “don’t eat me” signal for phagocytes, including macrophages and neutrophils, which protects normal cells from degradation and

phagocytosis. Inhibition of innate immunity by macrophages may also reduce adaptive immunity by blocking presentation by antigen presenting cells and recruitment of CTL and NK cells. Therefore, overexpression of CD47 was implicated to function as a “don’t eat me” signal on cancer cells, inhibiting phagocytosis and clearance by macrophages, thus, enhancing tumor development. The other CD47 ligand of the SIRP family, SIRP γ , is only found in human and primates and its expression is restricted to T-cell surface. SIRP γ /CD47 has been shown to modulate various functions of T-cells, including naïve T-cell co-stimulation (Piccio et al., 2005), to regulate chronically activated human T cells (Dehmani et al., 2021), and to activate human T-cell migration in tissue and during transendothelial migration (Gauttier et al., 2020; Stefanidakis et al., 2008). Thus, depending on the cell types and its ligand interaction, CD47 receptor has opposite roles by functioning as an innate immune checkpoint by inhibiting the cell destruction by phagocytes or as an adaptive immune actor which promotes T-cell response.

In summary, expression of CD70, ICAM-1, CD47 and Fas at the surface of Fas+ Apo-Exo could serve to reinforce the interaction between MHC-I loaded with antigen and naïve T cells. We can hypothesize that Fas mediated apoptosis of compromised cells induced by activated immune cells will generate Fas+ Apo-Exo that will disseminate and have the capacity to recruit and activate other T cells acting as a positive feedback amplification loop, which favors elimination of undesired cells (Fig. 5J). Moreover, the presence of these immune cell markers, in particular CD70 and CD47, in a complex with Fas at the surface of the epithelial cell could also favor the interaction of CTL and NK cells to promote compromised cell elimination.

A challenging issue in the field of EV biology is to determine the molecular mechanisms governing the specific loading of cargo proteins on secreted vesicles (Dixon et al., 2023). In this regard, our study suggests that Fas activation strongly contributes to the enrichment and localization of several transmembrane receptors, including CD70 and CD47, in EV, suggesting that some Fas molecular partners may be co-targeted in Exosomes together with the cargo molecule. This hypothesis is supported by several observations. First, immunofluorescence analysis suggests the presence of Fas and its co-receptors in the same endosomes. Second, modulations of Fas in Apo-Exo using different approaches (caspase-8 specific inhibitor, overexpression system, TNF α pre-treatment) influence the other members of the signaling complex (CD47, CD70) without affecting certain exosomal markers (Syntenin-1, CD63). We proved that, at least CD47 and CD70 co-aggregate with Fas at the cell surface following Fas activation, forming a multimeric signaling complex. CD47-Fas association has been already described and is proposed to enhance Fas pro-apoptotic signaling both *in vitro* and *in vivo* (Manna et al., 2005). To our knowledge Fas and the TNFSF ligand CD70 has never been linked molecularly or functionally. Our data demonstrate that they are associated in the same molecular complex at the cell surface once Fas is activated, suggesting that CD70 is recruited either directly or indirectly by Fas.

Our Proteomic analysis of Apo-Exo fraction has been conducted to identify the potential function role of these vesicles. However, our analysis demonstrates that this analysis helps to unravel new Fas binding partner such as CD70. The possible role of CD70 in the modulation of Fas cell death signaling has not been addressed in our study. However, it is known that interaction of transmembrane TNFSF ligand with their receptor trigger signals from the receptor part (forward signaling) as well as the ligand part (reverse signaling). CD70 interaction with CD27 has been shown to activate intracellular Calcium release and MAPK activation (Arens et al., 2005; García et al., 2004), suggesting a possible influence of CD70 on Fas signaling response. Beside CD70, a careful analysis of the possible link between Fas signaling and some of the proteins identified in Fas dependent-EV is worth being done.

Finally, we hypothesize that Fas+ Apo-Exo may serve as a biomarker to follow the immune response of cancer patient. Indeed, one of the main biomedical interests of EV is that once secreted by producing cells, they have the capacity to distribute in tissues and get easily accessible from body fluids, including urine and blood. Therefore, they can be harnessed as biomarkers and help with disease identification or to follow a response to therapy. Since immune cells use Fas/FasL system to eliminate cancer cells, Fas-dependent apoptotic EV could represent a good candidate to be used as a biomarker of the activity of the immune response in cancer patients and in particular in the context of immunotherapy, a revolutionary treatment of cancer in which biomarkers for characterizing patients who may benefit the most from immune-check points inhibitors are lacking.

Altogether our study helps to characterize the mechanism of biogenesis and the composition of EV secreted in response to apoptosis triggered by Fas activation. Our data suggest that Fas dependent EV may specifically target immune cells and have an immunomodulatory function. Future studies are required to prove such an immune related function and the possible use of these EV as a biomarker to evaluate the immune system efficiency of cancer patients.

Material and Methods

Reagents and antibodies

For immunoblot or immunofluorescence, antibodies against anti-Fas (B10), Dlg1/SAP97 (2D11), anti-Flotillin-1 (sc-25506), Erk-2 (sc-154), HSP70 (sc-24), HSC70 (sc-7298), anti-HSP90, anti-CD63 (sc-5275) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-caspase-8 (5D3), anti-caspase-9 (5B4) and Fadd (1F7) from MBL (Woburn, MA, USA); anti-EGFR (#4267), anti-cleaved caspase-3 (#9661), anti-cleaved caspase-7 (#8438), anti-cleaved caspase-8 (#9496), LAMP1 (#9091) and PARP from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); anti-caspase-10 from BioVision (Milpitas, CA, USA); anti-EEA1 (610457), anti-CD9 (555370) from BD transduction laboratories (Franklin Lakes, NJ, USA); anti-Fas (EPR5700), anti-E-cadherin (EP700Y), anti-caspase-10 (ab177475), TRAF2 (ab126758) from Abcam (Cambridge, UK); from Merck-Calbiochem (Darmstadt, Germany); CAR (GTX118382) from GeneTex (Irvine, CA, USA); from ThermoFisher (Rockford, IL, USA); Alix (12422-1-AP), Caspase-6 (10198-1-AP) from Proteintech (Rosemont, IL, USA); CD70 (AF2738), CD47 (AF4670), anti-ICAM-1 (BBA17) from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); anti-Syntenin-1 (A5497) from ABclonal (Dusseldorf, Germany). Fluorescent and HRP-conjugated secondary antibodies were from Molecular probes and Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) respectively. For FasL treatment, Flag-recombinant human FasL (FasL) from Alexis (San Diego, CA, USA) is crosslinked with anti-Flag M2 from Sigma (St Louis, MO, USA). TNF α was purchased from PeproTech (Cranbury, NJ, USA). Pharmacological inhibitors z-VAD-fmk were purchased from ENZO; z-IETD-fmk, CAY10444, JTE-013, Siponimod from TargetMOL; z-AEVD-fmk from R&D Systems.

Constructs

Human Syntenin-1-Myc retroviral plasmid (pLZRS-Syntenin-1-Myc) was obtained by PCR with peGFP-hSyntenin-1 as template and using 5'-AAATGTCTCTCTATCCATCTCTC-3' and 5'-TTATTACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC AACCTCAGGAATGGTGTGGTC -3 oligonucleotides. peGFP-hSyntenin-1 were a kind gift from P. Zimmermann (CRCM, Marseille, France). Fas wild-type and Δ SLV mutant cloned in the retroviral vector LXS Δ N have been described previously (Gagnoux-Palacios et al., 2018).

Cell Culture, Treatment, Transfection and viral infection

All cell lines were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum supplemented with non-essential amino acids (Gibco, Thermo Fischer Scientific). For siRNA transfection, cells were transiently transfected using RNAiMax lipofectamine reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. Syntenin-1, Alix, caspase-3, -6, -7 and -9 silencing were obtained using individual sequences for syntenin-1 (5'-CCAUGGAAAUGUAGCUGAA-3'); Alix (5'-AGAGCUGUGUGUUGUCAA-3'); caspase-3 (5'-GCGUGAUGUUUCUAAAGAA-3'); caspase-6 (5'-CUUUGGAUGUAGUAGAUAA-3'); caspase-7 (5'-GGAACUCUACUUCAGUCA-3');

9 (5'-GGACUUUCCUGCAACUCAA-3') and siRNA targeting luciferase as control (siCtrl: 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA-3').

Infection of Hacat with LXS retroviral vector expressing Fas wild-type and Δ SLV mutant and LZRS retroviral vector expressing Syntenin-1-Myc was performed as described (Gagnoux-Palacios et al., 2005). Briefly, infectious supernatants generated using phoenix retroviral producer cell line supplemented with polybrene were added to actively growing cells at high MOI followed by spinoculation procedure. Expressing cells were selected for neoresistance to geneticin (500 μ g/ml; Sigma-Aldrich) 48 hours after infection.

EV isolation by differential centrifugation

To obtain EVs, parental Hacat or stably expressing FasWT, Fas Δ SLV, Syntenin-1, CD63 cells were cultured in 100-mm petri dishes until they reach 50% confluency. Cells were then grown in serum-depleted medium for 16 hours with indicated doses of recombinant human Flag-FasL (FasL) cross-linked with 1 μ g/ml M2 antibody. EVs were isolated by a variation of a previously described protocol (Kowal et al., 2016). Briefly, cells were pelleted at 300 g for 10 min at 4°C. Supernatant was centrifuged at 2,000 g for 10 min at 4°C to obtain the 2K pellet. Supernatant was transferred to new tubes and centrifuged in a SW32 Ti rotor (Beckman) for 30 min at 10,000 g (10K pellet), and finally for 3 hours at 100,000 g (100K pellet). All pellets were washed in PBS and centrifuged at the corresponding speed before being resuspended in Immunoblot lysis buffer or sterile PBS for EM analysis.

Electron microscopy analysis of exosome

For negative staining, exosomal fractions were resuspended and fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS. Exosome fractions were applied onto freshly glow-discharged, formvar 150 mesh copper EM grids and incubated for 5 min at room temperature. The grids were then placed on drops of 1% uranyl acetate in water. Grids were air dried before visualization on JEM 1400 transmission electron microscope (JEOL) operated at 100 keV, equipped with a Morada SIS camera.

OptiPrep density gradient assay

Purified exosomes were loaded onto continuous OptiPrep Density Gradient Medium (40, 20, 10, and 5% iodixanol solution with 0.25 M sucrose and 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; Sigma-Aldrich) and centrifuged at 150,000 g for 15 h. 8 fractions were harvested, and proteins in each fraction were precipitated using TCA precipitation, washed with cold ethanol and solubilized with lysis buffer. Protein content was analyzed by immunoblot.

Preparation of FasL coated beads

400 μ l of Magnetic beads linked to human anti-mouse IgG (Dynabeads, Invitrogen) were incubated with 40 μ g M2 antibody for 1 hour at room temperature (RT) in DMEM-0.1%BSA on a wheel. M2-coated beads were washed and incubated 1 more hour with 2 μ g recombinant FasL in the same conditions. After washing, beads were kept at 4°C in sterile conditions or used

immediately for Fas activation. The same amount of uncoated beads was used as a control in these experiments.

Immunofluorescence and FasL-binding assay

For immunolabelling, cells attached to glass coverslips were fixed with 3.7% formaldehyde for 15 min at RT and either subsequently permeabilized with 0.1% Triton X-100 or incubated on ice in cold-methanol for 5 min. After 1 hour of saturation in PBS containing 1% BSA and overnight incubation at 4°C with the indicated primary antibodies, cells were washed with PBS and incubated with fluorescent-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes/Invitrogen) and DAPI (Sigma-Aldrich). Samples were analysed using an inverted IX81 Olympus microscope (Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, Pa), equipped with a motorized XY stage (Prior scientific, Cambridge, UK), a Yokogawa CSU-X1 confocal head (Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan), and a sensitive iXON DU-897-BV EMCCD camera (Andor technology, Belfast, UK) and a 100X objective. Z stacks were acquired using a piezo stage NanoScan Z100 (Prior scientific, Cambridge, UK). The system was controlled using MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). All experimental and control images of the IF or phase contrast data were collected using identical imaging settings and images merged using Fiji software tools (Schindelin et al., 2012).

Specific enrichment quantification

Fas specific enrichment in EEA1 labeled regions (defining early endosome) was quantified using Fiji software. Briefly, reference region, early endosomes (labeled by EEA1) was defined using intensity-based thresholds. The intensity of the marker of interest, endogenous Fas, was measured inside those predefined contours and each Z-plane of the images ($n > 5$) was analysed separately. Then, the intensity of the marker of interest, Fas, was measured in all cytosolic region to measure the basal level of expression. Finally, the enrichment factor was calculated by the ratio of the signal of interest inside/outside of early endosomes.

Peptide pull-down, immunoprecipitation and immunoblotting

Peptides corresponding to carboxyl terminals of human Fas (aa's 316-335 (Fas) or 316-332 (Fas Δ SLV)) were synthesized (GenScript, Piscataway, USA) and cross-linked to NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow beads according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). Pull-down experiments were performed using Hacat-FasWT cell lysates and interacting proteins were identified by immunoblot. Briefly, peptides coated-beads were added to cell lysates, and incubated for 2 hours at 4°C. Beads were washed in lysis buffer (20 mM HEPES [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 10 mM NaF, 20mM β -glycero-phosphate and a mix of protease inhibitors), and proteins bound to beads were separated by SDS-PAGE classical procedure. Immunoblot analysis of total proteins was performed according to standard protocols. Briefly, cells were lysed in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS containing phosphatase and protease

inhibitors. After preclearing by centrifugation and quantification, the solubilized proteins were denatured or not (to allow detection of CD63, CD9 and CD47) and resolved by SDS-PAGE. Immunoblotting was performed using the indicated primary antibody and HRP-coupled secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Quantitative densitometry was performed using ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Mass spectroscopy analysis

Protein spots were manually excised from the gel and destained by adding 100 mL of H₂O/ACN (1/ 1). After 10 min incubation with vortexing the liquid was discarded. This procedure was repeated two times. Gel pieces were then rinsed (15 min) with acetonitrile and dried under vacuum. Each excised spot was reduced with 50 mL of 10 mM dithiothreitol and incubated for 30 min at 56°C. Alkylation was performed with 15 mL of 55 mM iodoacetamide for 15 min at room temperature in the dark. Gel pieces were washed by adding successively (i) 100 mL of H₂O/ACN (1/1), repeated two times and (ii) 100 mL of acetonitrile. Next, gel pieces were reswelled in 60 mL of 50 mM NH₄HCO₃ buffer containing 10 ng/mL of trypsin (modified porcine trypsin sequence grade, Promega) incubated for 1 hour at 4°C. Then the solution was removed and replaced by 60 mL of 50 mM NH₄HCO₃ buffer (without trypsin) and incubated overnight at 37°C. Tryptic peptides were isolated by extraction with (i) 60 mL of 1% AF (acid formic) in water (10 min at RT) and (ii) 60 mL acetonitrile (10 min at RT). Peptide extracts were pooled, concentrated under vacuum and solubilized in 15 µL of aqueous 0.1% formic acid and then injected.

NanoHPLC-HRMS analysis was performed using a nanoRSLC system (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) coupled to an Easy Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific). Peptide separation was carried out using the Easy-nLC ultra high-performance LC system. 5 µL of peptides solution was injected and concentrated on a µ-Pre-column Cartridge Acclaim PepMap 100 C18 (i.d. 5 mm, 5 mm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) at a flow rate of 10 mL/min and using solvent containing H₂O/ACN/TFA 98%/2%/0.1%. Next peptide separation was performed on a 75 mm i.d. x 500 mm (2µm, 100 Å) PepMap RSLC C18 column (Thermo Fisher Scientific) at a flow rate of 300 nL/min. Solvent systems were: (A) 100% water, 0.1%FA, (B) 100% acetonitrile, 0.1% FA. The following gradient was used t = 0 min 2% B; t = 3 min 2% B; t = 103 min 20% B; t = 123 min 32% B; t = 125 min 90% B; t = 130 min 90% B; (temperature was regulated at 40°C). MS spectra were acquired at a resolution of 120 000 (200 m/z) in a mass range of 375–1500 m/z with an AGC target 3e6 value of and a maximum injection time of 25 ms. The 20 most intense precursor ions were selected and isolated with a window of 2 m/z and fragmented by HCD (Higher energy C-Trap Dissociation) with a normalized collision energy (NCE) of 30%. MS/MS spectra were acquired in the ion trap with an AGC target 5e5 value, the resolution was set at 15,000 at 200 m/z combined with an injection time of 22 ms.

MS data were subjected to LFQ analysis using the MaxQuant platform (v2.0.3.1) (<http://www.maxquant.org/>). Database search of the MS/MS data was performed in MaxQuant using the Andromeda search engine against Homo Sapiens reviewed UniProtKB database

(February 2023) and MaxQuant contaminants database. Digestion mode was set to Trypsin/ P specificity, with a fixed carbamidomethyl modification of cysteine, and variable modifications of protein N-terminal acetylation and methionine oxidation. Mass deviation was set to 20 ppm for the first and 6 ppm for the main search and the maximum number of missed cleavages was set to 2. Peptide and site false discovery rate (FDR) were set to 0.01. Proteins identification was performed using a minimum of 1 unique peptide. Quantification was achieved using the LFQ (Label-Free Quantification) algorithm. Unique peptide was used for LFQ quantification and the “label min. ratio count” was fixed at 1. The match between runs option was enabled, allowing a time window of 0.7 min to search for already identified peptides in all obtained chromatograms. Statistical evaluation of the data was performed with the freely available Perseus statistics software (version 1.6.15.0). Common contaminants, reverse decoy matches and only identified by site were removed from the protein identification list. At least 1 unique peptide per protein was required for a protein identification. Only proteins that were identified and quantifiable in at least 3 biological replicates in each group were used for relative quantification. For statistical evaluation the two-sample tests were used with Student’s T-test and the FDR calculation was based on Permutation based FDR with the default settings of the Perseus statistics software.

Statistical analysis

Data were analyzed using a homoscedastic two-tailed *t*-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. In figures, * and ** indicate respectively $p < 0.05$ and $p < 0.005$.

Online supplementary material

Fig. S1 demonstrates the efficiency of pharmacological caspase inhibitors and specific siRNA targeting caspases to block caspases activation following FasL treatment. Fig. S2 shows the impact of Syntenin-1 overexpression or knockdown mediated by siRNA transfection on Fas and EV markers expression. Fig. S3 shows the consequence of Alix knockdown on Fas total expression and Fas pro-apoptotic signaling. Table S1 shows the percentages of remaining cells after 16 hours of FasL+M2 treatment in each condition described in the text. Table S2 and S3 show the comprehensive listing of all proteins and the transmembrane receptors identified by LC-MS/MS analysis on sEV respectively.

Acknowledgements

We are grateful to Pascale Zimmermann and Rania Ghossoub for providing us expression vectors (human Syntenin-1), to the iBV facilities (PRISM, and Cytometry-A.loubat). This work was supported by institutional funding from Inserm, CNRS, and by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer. AM is supported by CNRS. Proteomic analyses were done using the mass spectrometry facility (<https://proteomique.ipmc.cnrs.fr>) of IPMC (Valbonne, France).

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: L. Gagnoux-Palacios and A.O. Hueber conceived the Study; L. Gagnoux-Palacios wrote the manuscript; Z. Servant and L. Gagnoux-Palacios designed, performed and analyzed most of experiments; S. Huault, A. Rossin A., G. Maharaux performed experiments; A. Mettouchi shares materials and help to design some experiments; A.S. Gay performed and analyzed MS/MS experiments; S. Ben Aicha performed, analyzed and quantified IF experiments.

Abbreviations List

Apo-Exo, apoptotic-cells derived exosome; DD, Death Domain; DISC, death-inducing signaling complex; EV, Extracellular vesicle; sEV, small Extracellular vesicle ; FasL, Fas ligand; IF, immunofluorescence; PDZ, PSD-95, Discs-large, ZO-1.

References

- Anikeeva, N., K. Somersalo, T.N. Sims, V.K. Thomas, M.L. Dustin, and Y. Sykulev. 2005. Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:6437-6442.
- Arens, R., P.A. Baars, M. Jak, K. Tesselaar, M. van der Valk, M.H. van Oers, and R.A. van Lier. 2005. Cutting edge: CD95 maintains effector T cell homeostasis in chronic immune activation. *J Immunol.* 174:5915-5920.
- Baietti, M.F., Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann, and G. David. 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 14:677-685.
- Brock, C.K., S.T. Wallin, O.E. Ruiz, K.M. Samms, A. Mandal, E.A. Sumner, and G.T. Eisenhoffer. 2019. Stem cell proliferation is induced by apoptotic bodies from dying cells during epithelial tissue maintenance. *Nat Commun.* 10:1044.
- Campos, Y., X. Qiu, E. Gomero, R. Wakefield, L. Horner, W. Brutkowsi, Y.G. Han, D. Solecki, S. Frase, A. Bongiovanni, and A. d'Azzo. 2016. Alix-mediated assembly of the actomyosin-tight junction polarity complex preserves epithelial polarity and epithelial barrier. *Nat Commun.* 7:11876.
- Castro-Cruz, M., L. Hyka, G. Daaboul, R. Leblanc, S. Meeussen, F. Lembo, A. Oris, L. Van Herck, S. Granjeaud, G. David, and P. Zimmermann. 2023. PDZ scaffolds regulate extracellular vesicle production, composition, and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 120:e2310914120.
- Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30:255-289.
- Cullen, S.P., C.M. Henry, C.J. Kearney, S.E. Logue, M. Feoktistova, G.A. Tynan, E.C. Lavelle, M. Leverkus, and S.J. Martin. 2013. Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells. *Mol Cell.* 49:1034-1048.
- Dehmani, S., V. Nerrière-Daguin, M. Néel, N. Elain-Duret, J.M. Heslan, L. Belarif, C. Mary, V. Thepenier, K. Bîteau, N. Poirier, G. Blancho, and F. Haspot. 2021. SIRP γ -CD47 Interaction Positively Regulates the Activation of Human T Cells in Situation of Chronic Stimulation. *Front Immunol.* 12:732530.
- Dieudé, M., C. Bell, J. Turgeon, D. Beillevaire, L. Pomerleau, B. Yang, K. Hamelin, S. Qi, N. Pallet, C. Béland, W. Dhahri, J.F. Cailhier, M. Rousseau, A.C. Duchez, T. Lévesque, A. Lau, C. Rondeau, D. Gingras, D. Muruve, A. Rivard, H. Cardinal, C. Perreault, M. Desjardins, É. Boilard, P. Thibault, and M.J. Hébert. 2015. The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci Transl Med.* 7:318ra200.
- Dieudé, M., I. Kaci, and M.J. Hébert. 2021. The Impact of Programmed Cell Death on the Formation of Tertiary Lymphoid Structures. *Front Immunol.* 12:696311.
- Dieudé, M., J. Turgeon, A. Karakeussian Rimbaud, D. Beillevaire, S. Qi, N. Patey, L.A. Gaboury, É. Boilard, and M.J. Hébert. 2020. Extracellular vesicles derived from injured vascular tissue promote the formation of tertiary lymphoid structures in vascular allografts. *Am J Transplant.* 20:726-738.
- Dixon, A.C., T.R. Dawson, D. Di Vizio, and A.M. Weaver. 2023. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 24:454-476.
- Dostert, C., M. Grusdat, E. Letellier, and D. Brenner. 2019. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev.* 99:115-160.
- Dustin, M.L., and T.A. Springer. 1988. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol.* 107:321-331.
- Gagnoux-Palacios, L., H. Awina, S. Audebert, A. Rossin, M. Mondin, F. Borgese, C. Planas-Botey, A. Mettouchi, J.P. Borg, and A.O. Hueber. 2018. Cell polarity and adherens junction formation inhibit epithelial Fas cell death receptor signaling. *J Cell Biol.* 217:3839-3852.
- Gagnoux-Palacios, L., C. Hervouet, F. Spirito, S. Roques, M. Mezzina, O. Danos, and G. Meneguzzi. 2005. Assessment of optimal transduction of primary human skin keratinocytes by viral vectors. *J Gene Med.* 7:1178-1186.

- García, P., A.B. De Heredia, T. Bellón, E. Carpio, M. Llano, E. Caparrós, P. Aparicio, and M. López-Botet. 2004. Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions. *J Leukoc Biol.* 76:263-270.
- Gauttier, V., S. Pengam, J. Durand, K. Biteau, C. Mary, A. Morello, M. Néel, G. Porto, G. Teppaz, V. Thepenier, R. Danger, N. Vince, E. Wilhelm, I. Girault, R. Abes, C. Ruiz, C. Trilleaud, K. Ralph, E.S. Trombetta, A. Garcia, V. Vignard, B. Martinet, A. Glémain, S. Bruneau, F. Haspot, S. Dehmani, P. Duplouye, M. Miyasaka, N. Labarrière, D. Laplaud, S. Le Bas-Bernardet, C. Blanquart, V. Catros, P.A. Gouraud, I. Archambeaud, H. Aublé, S. Metairie, J.F. Mosnier, D. Costantini, G. Blanco, S. Conchon, B. Vanhove, and N. Poirier. 2020. Selective SIRP α blockade reverses tumor T cell exclusion and overcomes cancer immunotherapy resistance. *J Clin Invest.* 130:6109-6123.
- Greening, D.W., S.K. Gopal, R. Xu, R.J. Simpson, and W. Chen. 2015. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 40:72-81.
- Horrevorts, S.K., D.A. Stolk, R. van de Ven, M. Hulst, B. van Het Hof, S. Duinkerken, M.H. Heineke, W. Ma, S.A. Dusoswa, R. Nieuwland, J.J. Garcia-Vallejo, A.A. van de Loosdrecht, T.D. de Gruijl, S.J. van Vliet, and Y. van Kooyk. 2019. Glycan-Modified Apoptotic Melanoma-Derived Extracellular Vesicles as Antigen Source for Anti-Tumor Vaccination. *Cancers (Basel).* 11.
- Hoshino, A., B. Costa-Silva, T.L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M. Tesic Mark, H. Molina, S. Kohsaka, A. Di Giannatale, S. Ceder, S. Singh, C. Williams, N. Soplod, K. Uryu, L. Pharmer, T. King, L. Bojmar, A.E. Davies, Y. Ararso, T. Zhang, H. Zhang, J. Hernandez, J.M. Weiss, V.D. Dumont-Cole, K. Kramer, L.H. Wexler, A. Narendran, G.K. Schwartz, J.H. Healey, P. Sandstrom, K.J. Labori, E.H. Kure, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M. de Sousa, S. Kaur, M. Jain, K. Mallya, S.K. Batra, W.R. Jarnagin, M.S. Brady, O. Fodstad, V. Muller, K. Pantel, A.J. Minn, M.J. Bissell, B.A. Garcia, Y. Kang, V.K. Rajasekhar, C.M. Ghajar, I. Matei, H. Peinado, J. Bromberg, and D. Lyden. 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 527:329-335.
- Hristov, M., W. Erl, S. Linder, and P.C. Weber. 2004. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 104:2761-2766.
- Huang, C.Y., Z.H. Ye, M.Y. Huang, and J.J. Lu. 2020. Regulation of CD47 expression in cancer cells. *Transl Oncol.* 13:100862.
- Jeppesen, D.K., A.M. Fenix, J.L. Franklin, J.N. Higginbotham, Q. Zhang, L.J. Zimmerman, D.C. Liebler, J. Ping, Q. Liu, R. Evans, W.H. Fissell, J.G. Patton, L.H. Rome, D.T. Burnette, and R.J. Coffey. 2019. Reassessment of Exosome Composition. *Cell.* 177:428-445.e418.
- Kajimoto, T., T. Okada, S. Miya, L. Zhang, and S. Nakamura. 2013. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun.* 4:2712.
- Kim, S.B., H.R. Kim, M.C. Park, S. Cho, P.C. Goughnour, D. Han, I. Yoon, Y. Kim, T. Kang, E. Song, P. Kim, H. Choi, J.Y. Mun, C. Song, S. Lee, H.S. Jung, and S. Kim. 2017. Caspase-8 controls the secretion of inflammatory lysyl-tRNA synthetase in exosomes from cancer cells. *J Cell Biol.* 216:2201-2216.
- Kowal, J., G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, and C. Théry. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113:E968-977.
- Kugeratski, F.G., K. Hodge, S. Lilla, K.M. McAndrews, X. Zhou, R.F. Hwang, S. Zanivan, and R. Kalluri. 2021. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol.* 23:631-641.
- Logtenberg, M.E.W., F.A. Scheeren, and T.N. Schumacher. 2020. The CD47-SIRP α Immune Checkpoint. *Immunity.* 52:742-752.
- Manna, P.P., J. Dimitry, P.A. Oldenborg, and W.A. Frazier. 2005. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 280:29637-29644.
- Muhsin-Sharafaldine, M.R., S.C. Saunderson, A.C. Dunn, J.M. Faed, T. Kleffmann, and A.D. McLellan. 2016. Procoagulant and immunogenic properties of melanoma exosomes, microvesicles and apoptotic vesicles. *Oncotarget.* 7:56279-56294.

- Park, S.J., J.M. Kim, J. Kim, J. Hur, S. Park, K. Kim, H.J. Shin, and Y.J. Chwae. 2018. Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115:E11721-E11730.
- Peter, M.E., R.C. Budd, J. Desbarats, S.M. Hedrick, A.O. Hueber, M.K. Newell, L.B. Owen, R.M. Pope, J. Tschopp, H. Wajant, D. Wallach, R.H. Wilttrout, M. Zörnig, and D.H. Lynch. 2007. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*. 129:447-450.
- Piccio, L., W. Vermi, K.S. Boles, A. Fuchs, C.A. Strader, F. Facchetti, M. Cella, and M. Colonna. 2005. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood*. 105:2421-2427.
- Rossin, A., G. Miloro, and A.O. Hueber. 2019. TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers (Basel)*. 11.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 9:676-682.
- Sirois, I., M.A. Raymond, N. Brassard, J.F. Cailhier, M. Fedjaev, K. Hamelin, I. Londono, M. Bendayan, A.V. Pshezhetsky, and M.J. Hebert. 2011. Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for antiapoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ*. 18:549-562.
- Stefanidakis, M., G. Newton, W.Y. Lee, C.A. Parkos, and F.W. Luscinskas. 2008. Endothelial CD47 interaction with SIRPgamma is required for human T-cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro. *Blood*. 112:1280-1289.
- van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 19:213-228.
- Vincent, T., R.F. Pettersson, R.G. Crystal, and P.L. Leopold. 2004. Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells. *J Virol*. 78:8047-8058.
- Wajant, H. 2016. Therapeutic targeting of CD70 and CD27. *Expert Opin Ther Targets*. 20:959-973.
- Willms, E., H.J. Johansson, I. Mäger, Y. Lee, K.E. Blomberg, M. Sadik, A. Alaarg, C.I. Smith, J. Lehtiö, S. El Andaloussi, M.J. Wood, and P. Vader. 2016. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*. 6:22519.
- Witherden, D.A., P. Verdino, S.E. Rieder, O. Garijo, R.E. Mills, L. Teyton, W.H. Fischer, I.A. Wilson, and W.L. Havran. 2010. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science*. 329:1205-1210.
- Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 4:594-600.

Data supplement

Figure S1

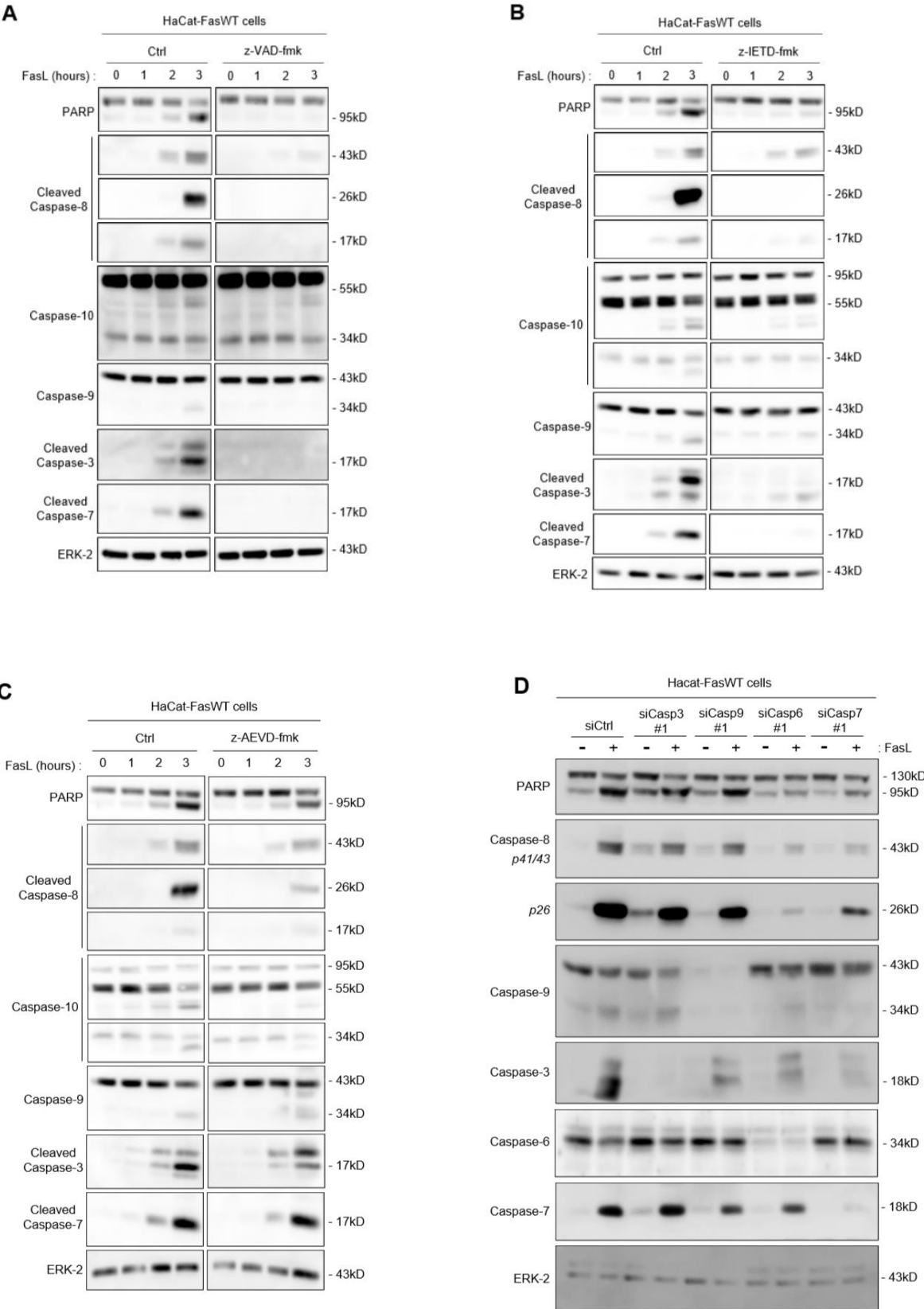
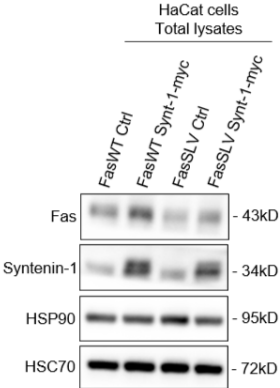


Figure S1: Consequences of caspases inhibitors treatment on caspases activation.

(A-C) Cell death was induced by FasL treatment (10 ng/ml+M2) at the indicated times in HacaT-FasWT cells in absence (Ctrl) or presence of caspase inhibitors z-VAD-fmk **(A)**, z-IETD-fmk **(B)**, or z-VAED-fmk **(C)**. Caspases activation was analyzed in total cell lysates by immunoblot following the disappearance of the native form of the caspase (caspase-6) or appearance of cleaved fragments (caspase-8, -3 and -7) or both (caspase-9 and -10). The cleavage of the executioner caspase target PARP was also analyzed. Erk-2 was used as a loading control. **(D)** Apoptosis was induced following a 3 hours treatment with FasL (10 ng/ml+M2) in HacaT-FasWT cells transfected with the indicated siRNAs. Caspases activation was analyzed in total cell lysates by immunoblot as above.

Figure S2

A



B

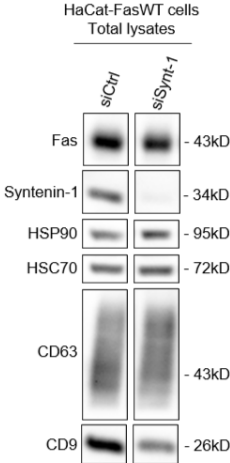


Figure S2: Impact of Syntenin-1 overexpression or knockdown on Fas and EV markers expression.

(A) Syntenin-1 and Fas expression was analyzed by immunoblot in the different Hacat-derived stable cell lines as indicated in the figure. (B) The efficiency of Syntenin-1 siRNA was verified by immunoblot.

Figure S3

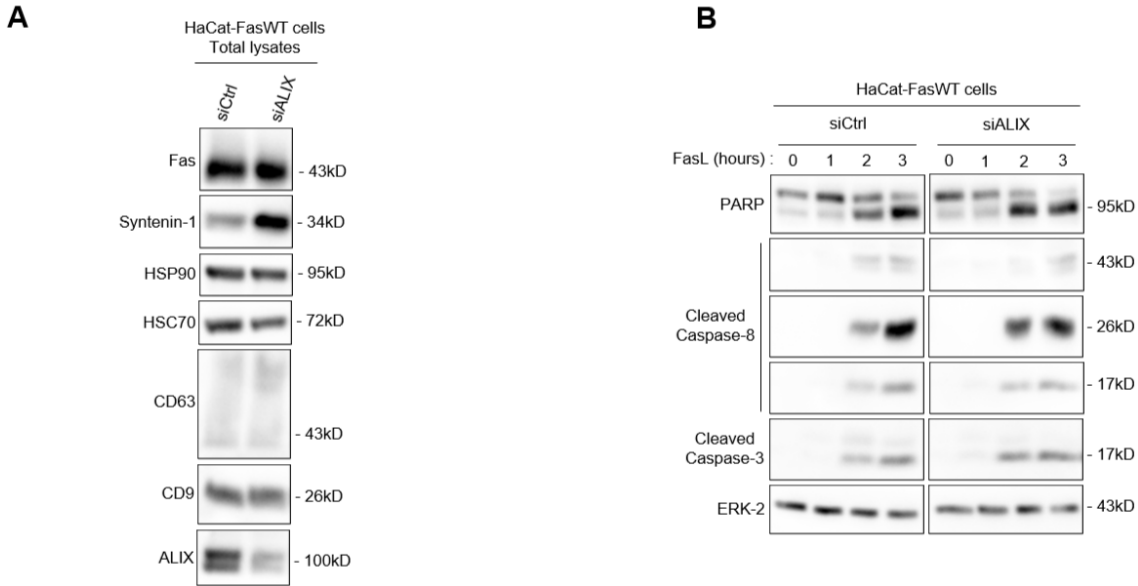


Figure S3: Impact of Alix depletion on Fas-mediated cell death and EV markers expression.

(A) The efficiency of Alix siRNA was verified by immunoblot. (B) Cell death was induced by FasL treatment (10 ng/ml+M2) at the indicated times in Hacat-FasWT cells transfected with a control (siCtrl) or a siAlix siRNA. Caspases activation was analyzed in total cell lysates by immunoblot as above.

Table S1

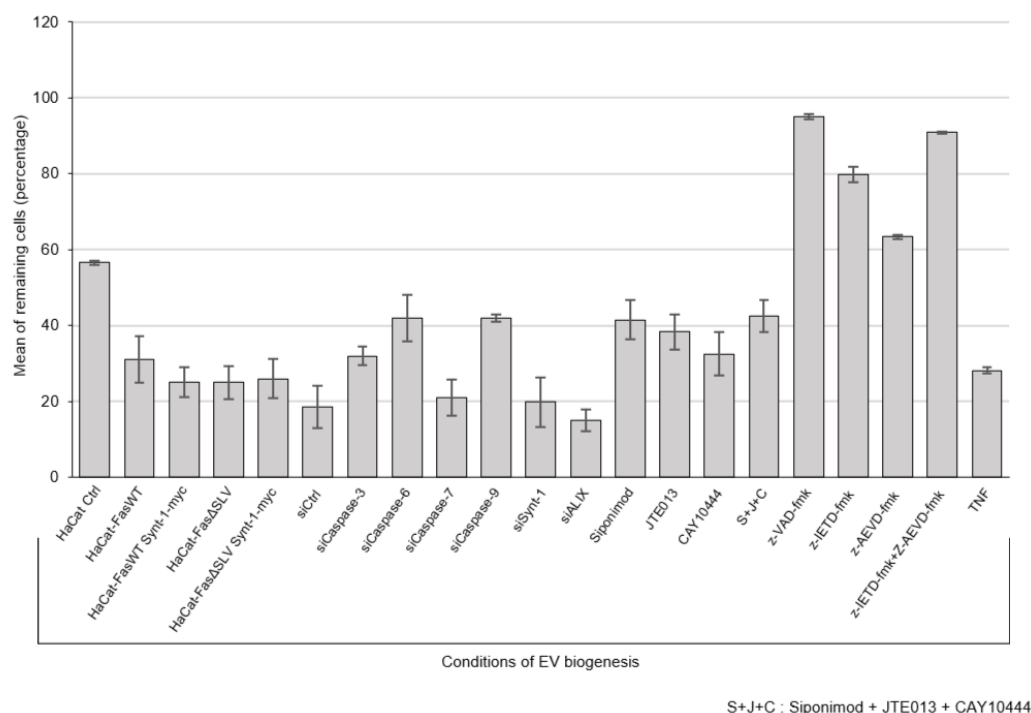


Table S1: Percentage of remaining cells after 16 hours of FasL+M2 treatment in each condition described in the text. The bars represent means \pm s.e.m. (n>3).

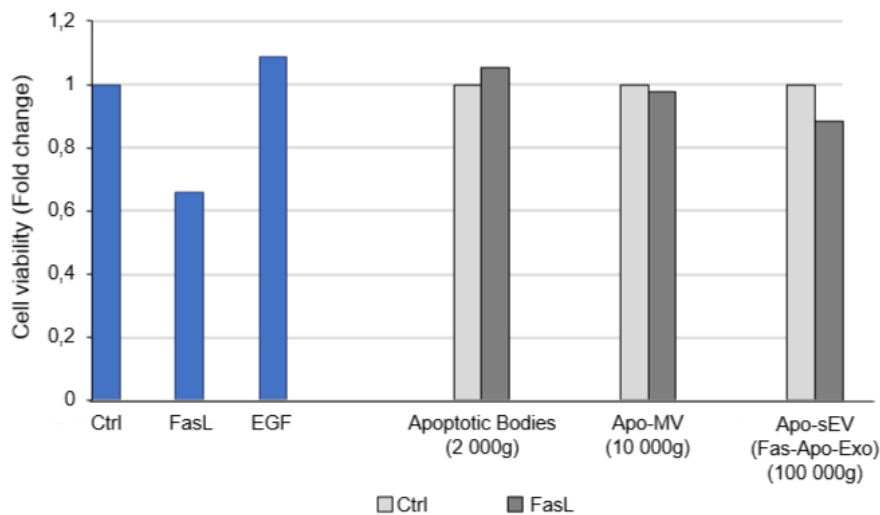
Table S2: Comprehensive listing of all proteins identified by LC-MS/MS analysis on sEV purified fractions

Table S3: Listing of the transmembrane proteins identified by LC-MS/MS analysis on sEV purified fractions

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Les résultats présentés dans cette section servent de support à certaines des hypothèses avancées dans la discussion de ce manuscrit et seront donc plus amplement discutés à cette occasion.

Résultat supplémentaire 1 : Les Fas-Apo-Exo produits par des cellules HaCat-FasWT n'induisent ni la prolifération ni l'apoptose des cellules épithéliales parentales (HaCat)



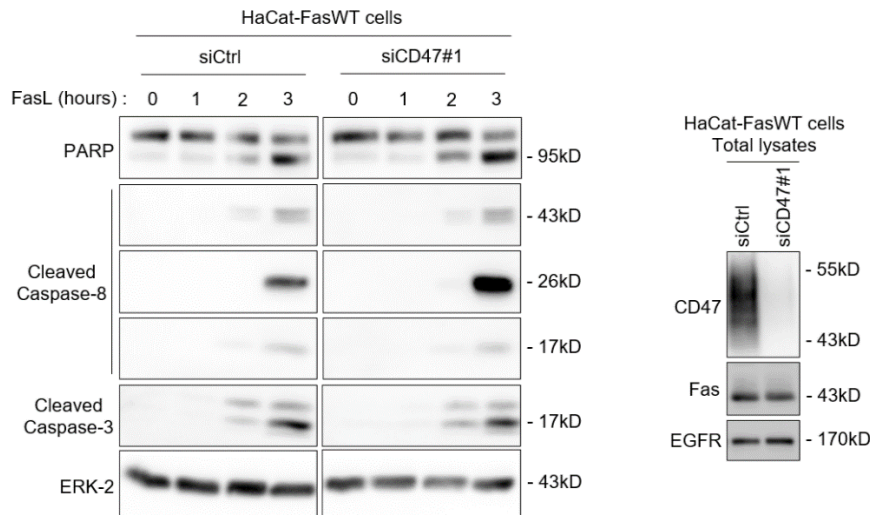
Test de viabilité cellulaire par MTT en contexte de traitements des cellules épithéliales (HaCat parentale) avec des VE purifiées à partir du milieu de culture de cellules épithéliales surexprimant Fas (HaCat-FasWT) stimulées ou non par FasL.

Nous avons initié une étude fonctionnelle visant à analyser la réponse phénotypique de cellules épithéliales viables à la suite d'un traitement avec les différentes VE sécrétées par des cellules épithéliales exprimant stablement une forme humaine de Fas sauvage (Fas-Wt) et traitées par FasL durant 16 heures afin d'induire l'apoptose. Un test de viabilité cellulaire (MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényl tétrazolium), révélant l'activité métabolique des cellules, a été utilisé pour évaluer l'induction de la prolifération ou de l'apoptose des cellules épithéliales après un traitement de 36 heures.

Les cellules épithéliales (HaCat parentale) ont étéensemencées puis traitées 24 heures plus tard avec du DMEM supplémenté de 5% de sérum bovin fœtal (FBS) et une fraction des différentes VE sécrétées par les cellules épithéliales apoptotiques surexprimant le récepteur Fas (HaCat-FasWT) obtenues à la suite de centrifugations différentielles. Des traitements « contrôles » par l'EGF et FasL/M2, permettant d'induire respectivement la prolifération ou la mort cellulaire, ont permis de vérifier la validité de notre test. 36 heures plus tard, le milieu est aspiré et les cellules sont mises en contact avec 100µL d'une solution de MTT à 0,5 mg/ml diluée dans du DMEM non supplémenté pendant 1 heure à 37°C. Les mitochondries des cellules vivantes réduisent le MTT en cristaux de formazan, solubles dans le DMSO et quantifiables par colorimétrie. Le DMEM est

aspiré et remplacé par 100µL de DMSO. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 550 nm. Nous constatons que le traitement par l'EGF induit une légère augmentation de prolifération cellulaire et que le traitement par FasL/M2 provoque la mortalité d'une partie des cellules, diminuant la réponse au MTT. Dans les conditions expérimentales testées, nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle des VE sécrétées à la suite de l'activation de Fas dans l'induction de la mort cellulaire ou l'induction de la prolifération cellulaire des cellules épithéliales.

Résultat supplémentaire 2 : CD47 ne modulerait pas la signalisation apoptotique de Fas



Analyse biochimique par Western blot de l'activation des caspases -8 et -3 au cours de la cinétique d'activation de Fas par FasL en contrôle (siCtrl) et en contexte de perte de fonction de CD47 (siCD47#1). L'ARN interférent siCD47#1 est vérifié à partir d'extraits cellulaires totaux par l'extinction de l'expression de CD47 en Western blot à la suite de la transfection des cellules HaCat-FasWT.

L'analyse de la signalisation apoptotique de Fas est réalisée par le suivi de l'état d'activation des caspases -8 et -3 au cours de la cinétique d'activation du récepteur Fas par traitement par FasL de 0 à 3 heures des cellules épithéliales HaCat-FasWT. L'état d'activation des caspases -8 et -3 est déterminée par l'apparition en Western blot des formes non-clivées inactives ou clivées actives de ces protéines et du ratio de la protéine PARP clivée par la caspase-3. La perte de fonction du récepteur CD47 par transfection d'un ARN interférent dans notre modèle (vérifié à partir d'extraits cellulaires totaux) n'induit pas de modulation significative du niveau d'expression de Fas, ni d'activation des caspases -8 et -3 au cours de la cinétique d'activation de Fas par son ligand FasL. Ce résultat suggère que CD47 ne module pas significativement la signalisation apoptotique de Fas selon l'analyse du niveau d'activation des caspases -8 et -3 et s'oppose aux résultats publiés (641).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'activation de Fas induit la biogenèse de vésicules extracellulaires apoptotiques exprimant Fas et d'autres molécules immuno-régulatrices

Notre étude est la première à démontrer que l'activation du récepteur Fas, au cours de l'apoptose, induit la production de différents types de VE apoptotiques qui expriment Fas à leur surface. Selon leur caractéristique morphologique, nous avons identifié ces VE comme correspondant à des corps apoptotiques, des microvésicules apoptotiques et des apo-exosomes. Nous avons alors nommé Fas-Apo-Exo ces apo-exosomes Fas+ générés au sein du système endosomal à la suite de l'activation du récepteur Fas.

Par conséquent, nous fournissons la première description des événements moléculaires de la formation des Fas-Apo-Exo en lien avec le transport endosomal de Fas et son incorporation dans les Fas-Apo-Exo. Nos résultats démontrent que la biogenèse des Fas-Apo-Exo débute par l'activation du récepteur Fas à la surface cellulaire, à l'origine de son oligomérisation et de son endocytose. Nous confirmons que Fas transite ensuite au sein du système endosomal, initialement au sein de l'endosome précoce, puis au sein de l'endosome tardif CD63+. Nous suggérons que le transport endosomal de Fas et sa présence dans l'endosome tardif CD63+ sont des prérequis à la biogenèse des Fas-Apo-Exo.

Nous proposons alors un mécanisme moléculaire de biogenèse des Fas-Apo-Exo et de l'incorporation de Fas dans les Fas-Apo-Exo au sein du compartiment endosomal tardif. Nos données démontrent que le mécanisme moléculaire de la biogenèse des Fas-Apo-Exo est médié par le complexe ALIX-Synt-1, acteur majeur de la biogenèse des exosomes en contexte non-apoptotique, et que les caspases sont requises pour la production des Fas-Apo-Exo. Leur inhibition conduit au blocage de la sécrétion des VE induite à la suite de l'activation de Fas, dont les Fas-Apo-Exo. Nous suggérons l'implication des caspases dans une régulation clé qui détermine la fusion du compartiment de formation des Fas-Apo-Exo avec la membrane plasmique, et donc concrétise la sécrétion des Fas-Apo-Exo. Nous révélons que les caspases sont également responsables de la présence de Fas dans les Fas-Apo-Exo, suggérant qu'elles jouent un rôle essentiel dans le transport de Fas au sein du système endosomal, indispensable à son incorporation dans les Fas-Apo-Exo. Enfin, nous montrons que l'incorporation de Fas dans les Fas-Apo-Exo implique son domaine d'interaction avec les protéines à domaine PDZ, mais que cet effet est indépendant de sa liaison à la Synt-1, qui n'est pas indispensable à la biogenèse des Fas-Apo-Exo.

Dans le but d'établir la composition spécifique des Fas-Apo-Exo, nous avons démontré que ces apo-exosomes expriment Fas ainsi que d'autres molécules immuno-régulatrices à leur surface, susceptibles de leur conférer une fonction particulière dans l'immunité. En effet, notre analyse protéomique du contenu des Fas-Apo-Exo révèle la présence de différentes molécules immuno-

régulatrices à leur surface, incluant HLA-I, CD70, CD47, ICAM-1. Nous démontrons que certaines de ces molécules, notamment CD47 et CD70, sont associées à Fas à la suite de son activation à la surface cellulaire, co-localisent avec Fas dans le compartiment endosomal et se retrouvent avec Fas à la surface des Fas-Apo-Exo. La présence de ces molécules dans les Fas-Apo-Exo est conditionnée et corrèle avec la présence de Fas dans les Fas-Apo-Exo. Ces données suggèrent une co-endocytose, un co-transport au sein du système endosomal et une co-incorporation dans les VIL de Fas et de ces molécules immuno-régulatrices. La présence de ces molécules à la surface des Fas-Apo-Exo pourrait donc leur conférer un rôle dans le ciblage et la régulation des cellules immunitaires, dont la fonction exacte reste à vérifier.

La compréhension des mécanismes de biogenèse des Fas-Apo-Exo est à approfondir

Rôle d'ALIX dans la biogenèse des Fas-Apo-Exo :

Notre travail démontre qu'ALIX, une protéine du complexe ESCRT impliquée dans la formation des exosomes, joue un rôle important dans la production des Fas-Apo-Exo. ALIX intervient lors d'un mécanisme classique de biogenèse des exosomes non apoptotiques (cf. « 1.2.1. La biogenèse des exosomes et des apo-exosomes » p15), suggérant l'implication d'acteurs moléculaires communs dans les mécanismes de biogenèse des exosomes apoptotiques et non-apoptotiques. Ces données apportent une confirmation supplémentaire de l'appartenance des Fas-Apo-Exo à la catégorie des « exosomes ». De plus, les caspases jouent un rôle essentiel dans leur biogenèse. Nous confirmons donc cette particularité du mécanisme de production des apo-exosomes à ce jour connue. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts que les caspases médient restent à déterminer.

Notre analyse protéomique révèle la présence de la protéine ALIX dans les Fas-Apo-Axo et apporte une preuve supplémentaire de son implication dans leur mécanisme de biogenèse. En revanche, les caspases n'ont pas été retrouvées, potentiellement du fait d'éventuels biais expérimentaux liés à la non-reconnaissance de certains peptides, due à l'auto-activation par clivages des caspases. Elles interviendraient en tant que modulateurs positifs de la biogenèse des Fas-Apo-Exo par leur action protéolytique sur des cibles moléculaires en faveur de cette biogenèse.

A l'inverse, les résultats obtenus dans notre modèle ne confirment pas les données préalablement établies démontrant le rôle majeur du système S1P/S1PR dans les mécanismes de biogenèse des apo-exosomes (cf. « 1.2.1. La biogenèse des exosomes et des apo-exosomes » p15). Cette contradiction peut s'expliquer par l'utilisation de différents inducteurs de mort, de différents types cellulaires, de la sous-population d'apo-exosomes étudiée, de leur spécificité de contenu et des mécanismes d'incorporation associés à ces molécules particulières.

ALIX est également connue sous le nom de « programmed cell death 6-interacting protein » (PDCD6IP) et pour son interaction avec le facteur pro-apoptotique ALG-2 (« apoptosis-linked gene 2 ») en présence de Ca^{2+} , modulant ainsi la signalisation apoptotique. ALIX présente alors

un effet inhibiteur de la signalisation apoptotique en séquestrant ALG-2. Cette interaction avec un facteur apoptotique et le rôle inhibiteur d'ALIX dans l'apoptose suggèrent un lien entre ALIX et les mécanismes moléculaires apoptotiques (642, 643). Ce lien entre ALIX et l'apoptose renforce la possibilité de son implication dans la biogenèse des Fas-Apo-Exo. De plus, la fonction anti-apoptotique d'ALIX pourrait laisser supposer que la biogenèse des Fas-Apo-Exo est un mécanisme protecteur de l'apoptose, potentiellement du fait de l'incorporation et de la séquestration d'un certain nombre d'acteurs de la signalisation pro-apoptotique dans les Fas-Apo-Exo, tels que Fas lui-même. Néanmoins, la perte de fonction d'ALIX, obtenue par transfection d'un ARN interférent, n'a aucun effet sur l'apoptose induite après traitement par FasL, suggérant que ce mécanisme n'est pas prépondérant dans la modulation de la mort cellulaire par Fas.

Contrairement au mécanisme classique impliquant le complexe ALIX-Synt-1 (cf. « I.2.1. La biogenèse des exosomes et des apo-exosomes » p15), la Synt-1 ne semble pas indispensable au mécanisme de biogenèse des Fas-Apo-Exo, suggérant un rôle prépondérant de la protéine ALIX ou son interaction avec d'autres partenaires moléculaires.

Acteurs de la biogenèse des exosomes ayant un lien avec ALIX :

Il est notamment démontré qu'ALIX peut interagir avec différentes endophilines (SH3p4, SH3p8 et SH3p13), acteurs majeurs des processus de remaniements membranaires, régulant l'endocytose des récepteurs (cf. partie « I.2.1.1. Les processus d'endocytose et de trafic d'un récepteur à travers l'endolysosome » p16). Cette interaction semble être à l'origine de la formation de structures vésiculaires à partir de la membrane d'un compartiment intracellulaire (644). Il pourrait donc être pertinent de déterminer si les endophilines jouent un rôle dans la biogenèse des Fas-Apo-Exo. En accord avec cette hypothèse, trois endophilines sont retrouvées enrichies dans la fraction exosomale après stimulation par FasL (Endophilin-A2, B1, et B2).

Une autre étude démontre que l'incorporation du récepteur Tfr dans les exosomes est dépendante d'une balance entre les mécanismes impliquant la protéine chaperonne HSC70 et ALIX. Ces mécanismes sont indépendants l'un de l'autre mais complémentaires afin d'assurer la sécrétion exosomale de Tfr (645). Il serait donc également intéressant de tester l'hypothèse de l'implication des protéines de la famille « heat shock protein » dans les mécanismes de biogenèse des Fas-Apo-Exo, d'autant que cette famille de protéines, associée au stress, est particulièrement représentée dans les Fas-Apo-Exo d'après l'analyse protéomique.

Cette étude révèle l'existence de compensations fonctionnelles entre les différents mécanismes de biogenèse des exosomes dépendants de HSC70 et d'ALIX (645). L'implication d'autres mécanismes permettrait donc d'expliquer que la perte de fonction d'ALIX ne bloque pas complètement la production des Fas-Apo-Exo.

Certaines de nos données étayent cette hypothèse. La perte de fonction de la Synt-1 semble

induire une augmentation de CD63 dans les Fas-Apo-Exo, suggérant une augmentation de son implication dans leur mécanisme de formation en contexte de perte de fonction de la Synt-1. De même, la perte de fonction de CD63 serait associée à l'augmentation de CD9 dans les Fas-Apo-Exo (résultat non présenté). Des compensations fonctionnelles entre différents mécanismes de biogenèse des Fas-Apo-Exo pourraient donc exister et renforcent la nécessité d'approfondir leur compréhension.

Acteurs de la biogenèse des exosomes révélés par l'analyse protéomique des Fas-Apo-Exo :

L'analyse protéomique révèle la présence de TSG101 dans les Fas-Apo-Exo et d'un certain nombre de membres de la famille des SNX et des Rab, des molécules impliquées dans le transport vésiculaire et la biogenèse de vésicules. Nous envisageons donc d'analyser le rôle de TSG101, en tant que composant majeur du complexe ESCRT, dans le mécanisme de biogenèse des Fas-Apo-Exo et des microvésicules apoptotiques. De même, l'étude du rôle des protéines du transport endolysosomal SNX et Rab (cf. partie « I.2.1.1. Les processus d'endocytose et de trafic d'un récepteur à travers l'endolysosome - Le système endosomal » p20) dans la production des Fas-Apo-Exo paraît pertinente. En effet, ces protéines de transport ont une fonction régulatrice essentielle dans la biogenèse des exosomes en contrôlant l'évolution du MVB au sein du système endosomal et son devenir entre dégradation lysosomale et fusion à la membrane plasmique. La fusion du MVB avec la membrane de la cellule concrétise la biogenèse des exosomes.

Les Fas-Apo-Exo se caractérisent également par la présence d'autres acteurs de la biogenèse des exosomes, tels que la Synt-1, CD63 et CD9. Nous avons démontré que la perte de fonction de ces protéines, par la transfection d'ARNs interférents, n'affecte pas la biogenèse des Fas-Apo-Exo, suggérant qu'elles ne sont pas impliquées dans les mécanismes moléculaires de leur biogenèse (résultats non montrés).

Par ailleurs, nous avons montré que le domaine d'interaction avec les protéines à PDZ de Fas est impliqué dans la genèse des Fas-Apo-Exo. Il a été publié récemment que les molécules d'échafaudage à domaines PDZ, autres que la Synt-1, peuvent jouer un rôle dans la formation d'exosomes en interagissant avec les tétraspanines et les syndécans (16). La présence d'une grande diversité de protéines à domaines PDZ retrouvées lors de notre crible, dont certaines que nous avons identifiées comme interagissant potentiel de Fas, semble indiquer que cette famille de molécules est impliquée dans la formation ou module la composition des Fas-Apo-Exo.

Autres protéines révélées par l'analyse protéomique du contenu des Fas-Apo-Exo :

Les protéines mentionnées jusqu'à présent dans le contenu des Fas-Apo-Exo, d'après l'analyse protéomique, sont des composants communs des exosomes et pouvaient donc être attendues dans les Fas-Apo-Exo. Néanmoins, parmi les autres composants identifiés dans notre crible protéomique et dans le but de déterminer la fonction de ces VE, ainsi que des biomarqueurs,

nous avons remarqué la présence de protéines participant à la modulation de la réponse immune telles que : le complexe HLA-I, le récepteur CD47, le ligand CD70 et la molécule d'adhésion inter-cellulaire ICAM-1.

Les fonctions des Fas-Apo-Exo restent à élucider

Les conséquences physiopathologiques du relargage de VE à la suite de l'apoptose ont été relativement bien étudiées. Les VE ont été décrites pour réguler plusieurs fonctions qui ont été détaillées précédemment dans l'introduction de ce manuscrit (partie I.6. et I.7. p44). Néanmoins, le rôle spécifique, ainsi que les étapes de biogenèse des apo-exosomes, dont la production peut être induite par différents inducteurs de mort, demeurent peu connus et seuls quelques groupes de recherche ont travaillé à leur compréhension. Ces études associent principalement les apo-exosomes à une fonction dans la dérégulation de l'immunité et s'accordent sur le fait que les apo-exosomes jouent un rôle d'agents pro-inflammatoires en activant le système de récepteur Toll par transfert à la cellule cible de DAMP ou motifs moléculaires associés aux dégâts (22, 144, 181). Par ailleurs, un petit nombre d'études suggère le rôle des VE dans la modulation positive du développement tumoral. Ces études suggèrent que l'apoptose de cellules tumorales induit la sécrétion de signaux mitogènes, qui incluraient des VE et donc des apo-exosomes. Ils favorisent la prolifération compensatoire des cellules cancéreuses en réponse à leur élimination par apoptose. Ce processus correspond à la prolifération induite par l'apoptose (AIP : « apoptosis-induced proliferation ») (268-270, 272).

Au cours de cette étude, nous avons donc tenté de mettre en évidence des pistes de fonctions physiopathologiques des Fas-Apo-Exo, notamment dans un contexte de développement tumoral. Cependant, cette approche « à l'aveugle » est complexe du fait de l'étendue possible des fonctions attribuées aux VE.

Nous avons débuté notre étude fonctionnelle par l'analyse des effets des Fas-Apo-Exo produits par des cellules épithéliales apoptotiques sur ces mêmes cellules épithéliales viables. Un test de viabilité cellulaire (MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényl tétrazolium), révélant l'activité métabolique des cellules, a été utilisé pour évaluer l'induction de la prolifération de type AIP ou de l'apoptose des cellules épithéliales. Notre objectif était ensuite de tester les effets des Fas-Apo-Exo sur des cellules cancéreuses colorectales. Cependant, nos données préliminaires (cf. résultat supplémentaire 1 du mémoire p180) n'ont pas permis de conclure sur un effet significatif des Fas-Apo-Exo sur les cellules épithéliales.

Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer que nos conditions expérimentales n'aient pas permis de mettre en évidence la fonction des Fas-Apo-Exo lors de ces tests de prolifération ou survie. L'intégrité fonctionnelle des Fas-Apo-Exo a pu ne pas être entièrement préservée, en particulier du fait de la technique d'extraction par ultracentrifugation, qui impose de fortes contraintes morpho-mécaniques. Il serait possible d'utiliser d'autres techniques, particulièrement

appropriées au contexte d'étude clinique des exosomes, comme l'extraction par immuno-affinité. Il est également possible que la quantité de Fas-Apo-Exo de nos traitements ne soit pas suffisante au déclenchement d'un effet biologique. Selon ces paramètres, les Fas-Apo-Exo pourraient ne pas avoir interagi efficacement avec les cellules réceptrices.

Les Fas-Apo-Exo pourraient également moduler d'autres fonctions des cellules épithéliales sécrétrices telles que la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires, comme nous l'avons précédemment présenté dans ce manuscrit (cf. partie « I.6.2.3. Le fonctionnement du tissu épithélial » p51). Des tests de migration cellulaire pourraient être réalisés en utilisant différentes approches techniques : 1) test de cicatrisation cellulaire ; 2) test de migration par la technique de la chambre de Boyden ; 3) test de migration sur cellule isolée par enregistrement en vidéo-microscopie.

Outre les tests fonctionnels, l'analyse du profil d'expression génétique des cellules cancéreuses traitées permettrait de révéler les adaptations génétiques de la cellule en réponse à un traitement par les Fas-Apo-Exo. Les perturbations de l'expression génétique pourraient être mieux détectées qu'une réponse phénotypique, via des RT-qPCR ou des analyses omiques plus approfondies (277, 336).

Il s'avèrerait également pertinent de tester le rôle des Fas-Apo-Exo sécrétés sur d'autres types de cellules réceptrices, tels que des cellules présentes dans l'environnement du tissu épithélial comme les cellules fibroblastiques, les cellules endothéliales, et en particulier, les cellules immunes pour lesquelles les Fas-Apo-Exo pourraient présenter un tropisme. Ce tropisme serait lié à l'expression d'un certain nombre de récepteurs ciblant les cellules immunes, dont nous avons étudié en détail l'expression et la régulation : le complexe HLA-I, CD47, CD70, ICAM-1, ainsi que Fas car FasL est exprimé à la surface de cellules immunes.

Parmi les molécules impliquant potentiellement les Fas-Apo-Exo dans un rôle immuno-régulateur, nous détaillerons plus particulièrement les fonctions du récepteur CD47 et du ligand CD70 présents à la surface des Fas-Apo-Exo, et par conséquent les fonctions des couples récepteur/ligand CD47/TSP-1, CD47/SIRP α , CD47/SIRP γ et CD27/CD70, pour leur lien avec Fas/FasL, comme nous allons le présenter par la suite. En effet, nous avons fait le choix de CD47 car il a été décrit comme un co-récepteur positif de la signalisation apoptotique de Fas. Quant à CD70, nous avons décidé d'approfondir ses fonctions en tant que ligand appartenant à la superfamille des TNF, au même titre que FasL. De plus, les systèmes Fas/FasL, CD47/TSP-1, CD47/SIRP α , CD47/SIRP γ et CD27/CD70 se caractérisent par leur rôle fondamental dans la régulation de la réponse immune, qu'elle soit innée ou adaptative.

Notre travail démontre que CD47 et CD70 se trouvent associés au complexe de signalisation du récepteur Fas à la membrane plasmique, mais également au sein des Fas-Apo-Exo. Nos résultats suggèrent d'ailleurs que la présence de CD47 et de CD70 au sein des Fas-Apo-Exo fait suite à la co-endocytose et au co-transport de ces molécules au sein du système endosomal.

Ces observations amènent donc deux questions : *i-* Quel est le rôle de l'association de ces molécules avec Fas à la membrane plasmique ? ; *ii-* Est-ce que la présence de ces molécules à la surface d'exosomes peut conférer une fonction particulière à ces vésicules, en particulier une fonction immuno-régulatrice ?

CD47 et CD70 : deux co-récepteurs de Fas présents à la membrane plasmique

Les protéines CD47 et CD70 :

CD47 est une protéine transmembranaire, de type cluster de différenciation (CD), qui se compose d'un domaine extracellulaire IgV, de 5 segments transmembranaires et d'une queue cytoplasmique (646) et qui est couplée aux grandes protéines G (protéine Gi) (647, 648). CD47 est exprimé de manière ubiquitaire à la surface des cellules saines, mais également des cellules cancéreuses, et interagit avec ses ligands : la trombospondine-1 (TSP-1), une protéine de la matrice extracellulaire ; SIRP α et SIRP γ (« signal inhibitory regulatory protein »), exprimés à la surface des cellules immunitaires (646, 649-655).

CD70 est également une protéine transmembranaire, qui appartient à la superfamille des ligands TNF (TNFLSF7) et présente le domaine très conservé de trimérisation des TNF (PLAD) (656, 657). CD70 interagit avec son récepteur CD27 de la TNFRSF (TNFRSF7). CD27 appartient à la catégorie des récepteurs de non-mort de la TNFRSF, présentant 3 domaines CRD et un motif d'interaction avec la famille de protéines adaptatrices TRAF. CD27 interagit en particulier avec TRAF2, TRAF3 et TRAF5 et est responsable de l'activation de la voie de signalisation de non mort NF- κ B (658, 659). L'expression de CD27 et de CD70 est majoritairement restreinte au système immunitaire, en particulier à un certain nombre de sous-populations de lymphocytes T et B et de cellules NK. Leur niveau d'expression varie en fonction du stade d'activation et de maturation de ces cellules immunitaires (660).

CD47 et CD70 peuvent s'associer avec le récepteur Fas à la membrane plasmique :

Il a été démontré que CD47 peut s'associer à Fas et est impliqué dans la régulation de la signalisation de Fas (641, 661). La stimulation du récepteur Fas induit une forte colocalisation de Fas et CD47. Une interaction protéine-protéine directe entre le domaine extracellulaire de Fas et le domaine extracellulaire IgV de CD47 est à l'origine de la modulation positive de la signalisation apoptotique de Fas (661). CD47 favoriserait l'agrégation de Fas (648, 662, 663). La modulation positive de la signalisation apoptotique de Fas médiée par CD47 semble contribuer à la fonction essentielle de Fas dans la régulation du système immunitaire. En effet, les souris déficientes en CD47 présentent des caractéristiques phénotypiques communes avec les souris déficientes en Fas (*lpr*) ou en FasL (*gld*), suggérant que CD47 renforce la fonction régulatrice du système Fas/FasL afin de prévenir le développement de maladies auto-immunes (602, 664). CD47 apparaît donc comme un modulateur positif de la signalisation apoptotique médiée par Fas (641).

Notre travail est partiellement en accord avec ces résultats. Nous confirmons que Fas et CD47 forment un complexe à la membrane plasmique à la suite de l'activation de Fas. Néanmoins, l'inhibition de l'expression de CD47 par transfection d'un ARN interférent dans notre modèle ne semble pas perturber la mort cellulaire induite par l'activation de Fas par son ligand (cf. résultat supplémentaire 2 du mémoire p181), suggérant que l'association de Fas et CD47 ne module pas sa signalisation pro-apoptotique. Il serait intéressant d'étudier l'influence de cette interaction sur la signalisation non-apoptotique de Fas. Nos résultats suggèrent que l'expression de CD47 est modulée par Fas lui-même. En effet, la surexpression de Fas suffit à entraîner une augmentation de l'expression de CD47 (non montré). D'autre part, l'activation de la voie non-apoptotique de Fas, conduisant notamment à la régulation de cytokines pro-inflammatoires, active fortement l'expression de CD47. Cette régulation de CD47 est également mise en évidence après traitement avec un autre membre des TNF, le TNF α , extrêmement puissant dans l'induction de la signalisation pro-inflammatoire.

Contrairement à l'interaction établie entre les récepteurs Fas et CD47, aucune association de CD70 avec le récepteur Fas ou un autre TNFR à la surface cellulaire n'a été mise en évidence. Néanmoins, nos observations démontrent également la formation d'un complexe entre Fas et CD70 à la membrane plasmique à la suite de l'activation de Fas. De plus, nos données révèlent que, tout comme la présence du récepteur CD47 dans les Fas-Apo-Exo, la présence du ligand CD70 dans les Fas-Apo-Exo est corrélée à celle du récepteur Fas. La présence de ces différentes molécules à la surface cellulaire et à la surface des Fas-Apo-Exo suggère leur co-endocytose, leur co-transport au sein du système endosomal et leur co-incorporation dans les Fas-Apo-Exo, leur permettant de conférer aux Fas-Apo-Exo une spécificité de ciblage cellulaire, ainsi que des fonctions potentiellement associées, et en particulier une fonction immuno-régulatrice.

Rôles de CD47 et de CD70 dans l'immunité et dans la lutte anti-tumorale :

Dans un contexte tumoral, la présence de CD47 à la surface des cellules tumorales peut conduire à l'activation de signaux suppresseur de tumeur, ou au contraire, favorisant le développement tumoral.

CD47 est exprimé de manière ubiquitaire et par les cellules cancéreuses de tumeurs solides ou hématologiques, incluant le lymphome non hodgkinien, la leucémie myéloïde, le glioblastome, ainsi que des cancers des ovaires, du sein, du côlon, de la vessie, du foie et de la prostate (665-667). Le système CD47/TSP-1 peut participer à l'élimination des cellules compromises, notamment des cellules cancéreuses, et à la lutte contre le développement tumoral. Quant à son ligand TSP-1, il est notamment produit par les cellules immunitaires, incluant les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) et les lymphocytes T. Sa fixation à CD47 présent à la surface des cellules cancéreuses induit leur élimination par apoptose indépendante de Fas et des caspases (668). L'activation de CD47 par un peptide agoniste ou un

anticorps anti-CD47 induit également cette élimination efficace par apoptose des cellules cancéreuses (668). En effet, plusieurs études s'accordent sur le fait que l'activation de CD47 peut induire l'apoptose indépendante du récepteur Fas et des caspases, mais partiellement dépendante de la protéine Gi et d'une cascade de phosphorylations médiée par les kinases de la famille de la protéine kinase A, selon les modulations du niveau d'AMP cyclique intracellulaire (668-670). Le système CD47/TSP-1 a donc une fonction anti-tumorale en contribuant à l'élimination des cellules cancéreuses.

CD47 peut avoir des rôles différents en fonction du ligand avec lequel il interagit. Lorsque CD47 interagit avec SIRP α , le système CD47/SIRP α intervient dans l'inhibition de la réponse immunitaire adaptative. En effet, il est démontré qu'un anticorps agoniste anti-SIRP α , qui cible SIRP α exprimé par les cellules immunitaires, présente un effet inhibiteur anti-inflammatoire. Dans des modèles pré-cliniques de maladies auto-immunes inflammatoires, telles que l'arthrite et la colite, le ciblage de SIRP α réduit le taux de neutrophiles et de monocytes au sein du tissu, limitant la réponse auto-immune inflammatoire. La chimiotaxie des neutrophiles et des monocytes, ainsi que l'infiltration du tissu sont alors diminuées. SIRP α constitue donc une cible prometteuse pour la régulation de la réponse immunitaire afin de préserver l'intégrité des cellules saines, de prévenir les réponses inflammatoires excessives et dans le cadre du traitement des maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes (671).

Néanmoins, dans le cadre du développement tumoral, le système CD47/SIRP α peut également limiter la phagocytose et l'élimination des cellules cancéreuses (« don't eat me signal ») médiées par les macrophages et promouvoir l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire et à la croissance tumorale (672-674). En effet, dans les macrophages, SIRP α est démontré comme à l'origine de leur régulation négative. La signalisation SIRP α interfère avec la voie de signalisation des tyrosine kinases et l'activation des récepteurs activateurs des macrophages de type ITAM (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif »), provoquant l'inhibition de la prolifération et de l'activation de ces cellules immunitaires respectivement (675). Le système CD47/SIRP α peut donc avoir, quant à lui, un effet pro-tumoral en inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale.

Enfin, lorsque CD47 interagit avec SIRP γ exprimé par les lymphocytes, CD47 intervient dans la régulation positive de la réponse immunitaire adaptative en favorisant l'activation des lymphocytes. Le système CD47/SIRP γ agit en tant que co-stimulateur positif lors de l'activation des lymphocytes T par la reconnaissance via le TCR des antigènes présentés, renforçant ainsi leur activation et confirmant la présence d'un contexte pathologique nécessitant leur mobilisation (676). CD47, cette fois via son interaction avec SIRP γ , promeut la réponse immunitaire anti-tumorale.

Concernant le système CD27/CD70, plusieurs études s'accordent sur le fait que CD27/CD70 joue également un rôle essentiel de co-stimulateur lors de l'activation des lymphocytes T. La co-stimulation médiée par CD27/CD70 favorise le processus de présentation d'antigènes, la prolifération des lymphocytes, la production de cytokines, et par conséquent l'efficacité de la réponse immunitaire (677-681). De plus, il est notamment démontré que le renforcement de la signalisation associée à CD27 exprimé par les cellules immunitaires, par l'utilisation d'anticorps agoniste ciblant CD27, inhibe la croissance tumorale en favorisant la mobilisation du système immunitaire, en particulier des lymphocytes T, dans la lutte contre la tumeur. Dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale, le récepteur CD27 apparaît donc comme une cible thérapeutique d'intérêt pour la modulation positive de la réponse lymphocytaire anti-tumorale du patient (682, 683).

Les systèmes CD27/CD70, CD47/TSP-1 et CD47/SIRP γ , au même titre que Fas/FasL, sont donc impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative afin de préserver l'intégrité de l'organisme et s'avèrent des cibles d'intérêt dans un contexte pathologique, en particulier dans le renforcement de l'immunité anti-tumorale. En effet, les systèmes CD27/CD70, CD47/TSP-1 et CD47/SIRP γ peuvent avoir des fonctions anti-tumorales en favorisant l'élimination des cellules cancéreuses. Cependant, les potentielles fonctions contradictoires du récepteur CD47 dans le développement tumoral, notamment par son action inhibitrice sur les phagocytes (CD47/SIRP α), nécessiteront des validations par l'expérimentation.

Fonctions immuno-régulatrices potentielles liées à la présence de Fas et de molécules immunomodulatrices (CD47, CD70, HLA-I et ICAM-1) à la surface des Fas-Apo-Exo

Le rôle essentiel des VE dans la modulation du système immunitaire est largement étudié et correspond à la première fonction mise en évidence des VE (cf. partie « 1.6.2.2. Le fonctionnement du système immunitaire » p47).

Conséquence d'une interaction CD47/SIRP α :

Comme nous l'avons présenté précédemment, le système CD47/SIRP α est impliqué dans l'inhibition de la réponse immunitaire inflammatoire et apparaît comme une cible thérapeutique d'intérêt dans le cadre des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques. Cependant, en contexte de développement tumoral, l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par le système CD47/SIRP α favoriserait l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire et la croissance tumorale. Par conséquent, le récepteur CD47 exprimé à la surface des Fas-Apo-Exo, via son interaction avec SIRP α , serait susceptible de provoquer une inhibition de la réponse immunitaire. Les Fas-Apo-Exo auraient donc un effet pro-tumoral en favorisant l'échappement des cellules cancéreuses à la réponse immunitaire anti-tumorale.

A l'inverse, nous pouvons supposer que le ciblage de SIRP α à la surface des cellules immunitaires par les Fas-Apo-Exo pourrait s'avérer efficace dans la modulation négative de l'inflammation associée au microenvironnement tumoral, considérée comme un facteur propice à

la croissance tumorale. Les Fas-Apo-Exo pourraient donc être des vecteurs efficaces pour le ciblage de SIRP α exprimé par les cellules immunitaires et limiter l'inflammation pro-tumorale du microenvironnement dans le cadre de traitements de cancers, mais aussi limiter l'inflammation dans un contexte de maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques.

La présence de CD47 à la surface des Fas-Apo-Exo, par interaction avec son ligand SIRP α , est donc susceptible de leur conférer des fonctions divergentes. L'impact positive ou négatif de la présence de CD47 à la surface des Fas-Apo-Exo sur la progression tumorale pourra potentiellement dépendre du type de cancer et du stade d'avancement de la pathologie.

Conséquence d'une interaction CD27/CD70, CD47/SIRP γ et ICAM-1/LFA-1 dans le ciblage des lymphocytes :

Nous avons présenté précédemment le rôle des systèmes CD27/CD70 et CD47/SIRP γ dans la co-stimulation, à l'origine de la potentialisation de la réponse immunitaire.

Les Fas-Apo-Exo, présentant à leur surface le ligand de CD27, CD70, et/ou dans le cadre d'une interaction de CD47 à la surface des Fas-Apo-Exo avec son ligand SIRP γ , pourraient participer au renforcement de l'activation des lymphocytes et de la réponse immunitaire. En parallèle, la présence de Fas à la surface des Fas-Apo-Exo favoriserait encore davantage ce processus en renforçant l'interaction avec les lymphocytes exprimant FasL. La présence du ligand CD70 et des récepteurs CD47 et Fas à la surface des Fas-Apo-Exo, en synergie, serait donc particulièrement efficace dans le ciblage, la stimulation et la mobilisation du système immunitaire du patient pour l'élimination des cellules cancéreuses.

D'autre part, CD70 peut être exprimé de manière aberrante par les cellules cancéreuses, en particulier du carcinome rénal, du cancer du pancréas, du larynx, des ovaires et du colon, ainsi que du glioblastome et du mélanome (684-687). Cette expression apparaît contre-intuitive car potentiellement à l'origine de l'antigénicité des cellules cancéreuses. En effet, il a été démontré que la sécrétion de CD70 soluble par les cellules cancéreuses module positivement la réponse immunitaire anti-tumorale (688, 689), renforçant notre hypothèse de l'efficacité des Fas-Apo-Exo et de l'intérêt thérapeutique de la présence de CD70 à leur surface. Cependant, un effet immunitaire inhibiteur peut apparaître du fait de l'épuisement des réserves de lymphocytes T disponibles et du recrutement de lymphocytes T régulateurs au niveau du site de la tumeur, provoquant l'extinction progressive de la réponse anti-tumorale (690, 691). Dans ce contexte, les Fas-Apo-Exo pourraient donc avoir un effet pro-tumoral en inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale.

La présence de CD70, de Fas et de CD47 à la surface des Fas-Apo-Exo pourrait donc leur conférer préférentiellement un rôle potentialisateur de la réponse immunitaire, et notamment de la réponse immunitaire anti-tumorale. Notre étude démontre également la présence de la molécule ICAM-1 à la surface des Fas-Apo-Exo. ICAM-1, en interagissant avec LFA-1 présent à la surface des lymphocytes (692), renforcerait la stabilisation de la synapse immunologique

médiée par l'interaction du complexe HLA-I/antigène présent à la surface des Fas-Apo-Exo. Cependant, la variabilité de fonctions des Fas-Apo-Exo, à savoir leurs possibles rôles anti-inflammatoire et inhibiteur du système immunitaire, pourrait dépendre du type de tumeur, ainsi que des stades du développement tumoral et de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les Fas-Apo-Exo pourraient s'avérer plus prometteurs à des stades précoces du développement du cancer et/ou en combinaison avec d'autres traitements.

Le mécanisme potentiel d'action des Fas-Apo-Exo sur les cellules immunitaires et la régulation de la réponse immunitaire :

Dans le cadre de la réponse immunitaire, les cellules immunitaires assurent l'élimination des cellules compromises et cancéreuses, notamment via le système Fas/FasL. Nous pouvons supposer que ces cellules, qui sont éliminées par apoptose, sécrètent des Fas-Apo-Exo qui circulent via les fluides de l'organisme. Ces Fas-Apo-Exo, grâce à la présence de Fas, CD47, CD70, ICAM-1 et HLA-1 à leur surface, seraient susceptibles de jouer un rôle potentialisateur de la réponse immunitaire en interagissant directement avec les lymphocytes et provoquant leur activation de manière particulièrement efficace. Par conséquent, les Fas-Apo-Exo sécrétés par les cellules compromises ou cancéreuses apoptotiques éliminées par le système immunitaire permettraient le renforcement de l'activation et du recrutement des cellules immunitaires et seraient à l'origine de la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif de la réponse immunitaire pour l'élimination des cellules compromises et cancéreuses.

Les Fas-Apo-Exo pourraient être utilisés comme biomarqueurs de l'élimination des cellules cancéreuses et de l'efficacité des thérapies anti-tumorales

Lors de la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale, les lymphocytes cytotoxiques et les cellules NK infiltrant la tumeur sont présents dans le microenvironnement tumoral. Ces cellules immunitaires qui expriment FasL à leur surface sont capables de déclencher la signalisation apoptotique dans les cellules cancéreuses par plusieurs mécanismes, dont l'un implique l'activation du récepteur de mort Fas. L'élimination des cellules cancéreuses par apoptose est un mécanisme clé de lutte contre la tumeur. Certaines thérapies anti-tumorales, et notamment l'immunothérapie, ont pour but de renforcer la réponse immunitaire du patient pour lutter plus efficacement contre la tumeur (629). En effet, l'immunothérapie, qui a largement fait ses preuves en termes d'efficacité, est une approche notamment basée sur la levée des points de contrôle du système immunitaire (« immune checkpoint ») afin de renforcer l'efficacité du système immunitaire. Les points de contrôle du système immunitaire font intervenir des couples ligand/récepteur dans la modulation de l'activation des cellules immunes afin de limiter la durée et l'intensité de la réponse immunitaire. Les cellules cancéreuses détournent les mécanismes régulateurs médiés par ces couples ligand/récepteur, à l'origine de l'inhibition du système immunitaire, au profit de la croissance tumorale. Les anti-checkpoints actuellement utilisés en immunothérapie permettent de lutter contre cette inhibition du système immunitaire provoquée

par les cellules cancéreuses. L'une de ces approches d'immunothérapie anti-PD-L1 vise à bloquer la liaison de PD-L1, exprimé par les cellules cancéreuses, à son récepteur inhibiteur PD1, exprimé à la surface des lymphocytes cytotoxiques. L'utilisation de ce type d'anticorps (anti-PD-L1) empêche donc l'inhibition de la réponse immunitaire par les cellules cancéreuses en levant les points de contrôle du système immunitaire. La réponse immunitaire anti-tumorale est ainsi réactivée (693-696).

Nos travaux suggèrent que l'élimination des cellules cancéreuses par le système Fas/FasL conduit à la sécrétion de Fas-Apo-Exo qui diffusent dans l'environnement tumoral et à plus longue distance en circulant dans les fluides corporels du patient (urine, sang, salive, transpiration). Etant donné que l'immunothérapie vise à augmenter la capacité d'élimination des cellules tumorales par les cellules immunes, et donc la mort induite par Fas, nous sommes en droit de penser que la quantité de Fas-Apo-Exo présente dans le sang de patients traités par immunothérapie sera plus forte après traitement si celui-ci est efficace chez ce patient.

Jusqu'à présent, l'une des difficultés de l'immunothérapie est que certains patients sont totalement réfractaires à cette thérapie et que dans certains cas l'immunothérapie anti-PD1 provoque même une augmentation du développement tumoral. Afin de mesurer la réactivité de chaque patient à l'immunothérapie, il est important de trouver des critères précis d'indication de traitement, mais aussi de pouvoir suivre l'efficacité de la réponse anti-tumorale. Dans ce contexte, nous pensons que la détection sanguine des Fas-Apo-Exo à partir d'échantillons de sang prélevés chez le patient avant et au cours du traitement permettrait de mesurer la réponse de chaque patient au traitement.

Notre analyse du contenu des Fas-Apo-Exo a permis de mettre en évidence une combinaison de molécules spécifiques dans les apo-exosomes dépendants de Fas. Par conséquent, ces molécules pourraient être utilisées comme des marqueurs de reconnaissance des Fas-Apo-Exo circulant dans les fluides biologiques. En effet, dans un cadre de diagnostic thérapeutique, les VE constituent déjà des biomarqueurs pertinents pour la mise en évidence et l'identification de cellules pathologiques, en particulier en oncologie (314, 347, 348, 350-352).

Les Fas-Apo-Exo issus des cellules cancéreuses pourraient être collectés par prélèvement et biopsie des fluides corporels du patient, et leur détection serait possible grâce aux marqueurs spécifiques que nous avons identifiés. Le taux de Fas-Apo-Exo évalué dans le sang de patients atteints de cancer est donc susceptible d'être corrélé avec le taux d'apoptose des cellules cancéreuses, et par conséquent avec l'efficacité du traitement par immunothérapie. De ce fait, il pourrait refléter le niveau d'activation du système immunitaire, mobilisé pour l'élimination des cellules cancéreuses et la lutte contre le développement de la tumeur.

Grace à cette approche, il serait potentiellement possible d'évaluer la réponse du patient à la thérapie anti-tumorale appliquée, ainsi que d'affiner ou de valider la stratégie en fonction de ces données, et ceci à des stades précoces de la prise en charge du patient.

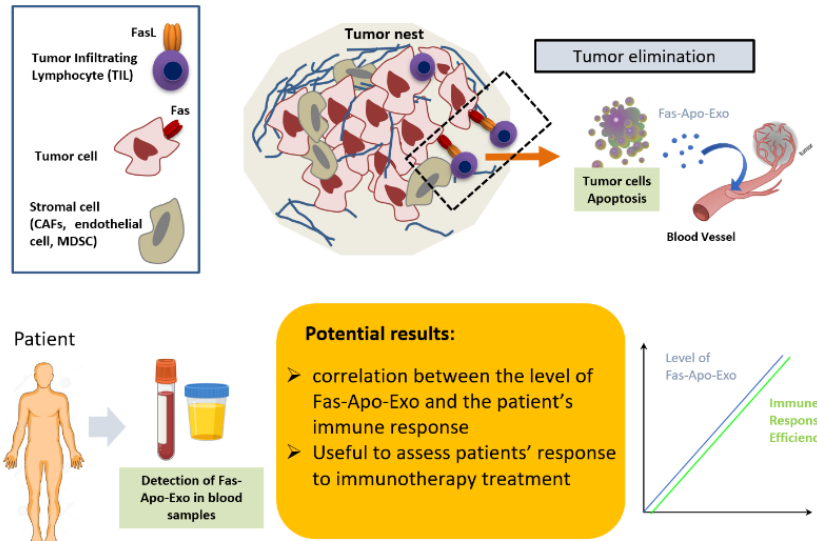


Figure 38 : Fas-Apo-Exo comme biomarqueurs de l'efficacité des thérapies anti-tumorales

Les Fas-Apo-Exo pourraient donc être utilisés comme biomarqueurs de l'efficacité de la thérapie anti-tumorale appliquée au patient et ouvrir des perspectives de médecine personnalisée. De plus, il sera envisageable de confirmer la provenance de ces Fas-Apo-Exo en identifiant des molécules spécifiques du type de cancer dont est atteint le patient, afin d'estimer la spécificité de ciblage des cellules cancéreuses par la thérapie et sa toxicité sur les cellules saines.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons initié une étude clinique en collaboration avec les cliniciens du Centre Antoine Lacassagne (CAL), Pr Olivier Humbert et Dr Esmâ Saada-Bouzid, afin de mesurer le taux de Fas-Apo-Exo présent dans le plasma de patients souffrant de cancers épithéliaux.

Notre analyse protéomique du contenu des apo-exosomes dépendants de l'activation de Fas révèle la présence d'une grande diversité de molécules spécifiquement présentes ou enrichies dans les Fas-Apo-Exo. L'exploitation de ces données ouvrent de nombreuses pistes pour parvenir à approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires de biogenèse des Fas-Apo-Exo, ainsi que de leurs fonctions physiologiques et pathologiques, en particulier dans la régulation de la réponse immunitaire et en oncologie. La poursuite du projet aura pour objectif de progresser sur ces aspects mécanistiques et fonctionnels majeurs. L'élucidation de ces problématiques construirait des avancées essentielles dans la recherche fondamentale et clinique sur les exosomes en contexte apoptotique, qui demeurent à ce jour, une des catégories de VE la moins comprise.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. CHARGAFF, R. WEST, The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* **166**, 189-197 (1946).
2. P. Wolf, The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **13**, 269-288 (1967).
3. N. Crawford, The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *Br J Haematol* **21**, 53-69 (1971).
4. H. C. Anderson, Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* **41**, 59-72 (1969).
5. E. A. Nunez, J. Wallis, M. D. Gershon, Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. 3. The occurrence of extracellular vesicles and colloid droplets during arousal from hibernation. *Am J Anat* **141**, 179-201 (1974).
6. A. J. Dalton, Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles. *J Natl Cancer Inst* **54**, 1137-1148 (1975).
7. G. Raposo *et al.*, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**, 1161-1172 (1996).
8. L. Zitvogel *et al.*, Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **4**, 594-600 (1998).
9. Y. Couch *et al.*, A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **10**, e12144 (2021).
10. S. Caruso, I. K. H. Poon, Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front Immunol* **9**, 1486 (2018).
11. G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* **200**, 373-383 (2013).
12. G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 213-228 (2018).
13. Y. Yuana, A. Sturk, R. Nieuwland, Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* **27**, 31-39 (2013).
14. D. K. Jeppesen, Q. Zhang, J. L. Franklin, R. J. Coffey, Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends Cell Biol* **33**, 667-681 (2023).
15. J. Kowal *et al.*, Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E968-977 (2016).
16. M. Castro-Cruz *et al.*, PDZ scaffolds regulate extracellular vesicle production, composition, and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**, e2310914120 (2023).
17. E. Willms *et al.*, Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* **6**, 22519 (2016).
18. D. K. Jeppesen *et al.*, Reassessment of Exosome Composition. *Cell* **177**, 428-445.e418 (2019).
19. J. H. Hurley, ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 4-11 (2008).
20. C. Tricarico, J. Clancy, C. D'Souza-Schorey, Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* **8**, 220-232 (2017).
21. S. J. Gould, G. Raposo, As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **2**, (2013).
22. S. J. Park *et al.*, Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E11721-E11730 (2018).
23. A. Sorkin, M. von Zastrow, Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 609-622 (2009).
24. H. T. McMahon, E. Boucrot, Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 517-533 (2011).
25. A. Casamento, E. Boucrot, Molecular mechanism of Fast Endophilin-Mediated Endocytosis. *Biochem J* **477**, 2327-2345 (2020).
26. M. Kirkham, R. G. Parton, Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 349-363 (2005).

27. C. Gundu *et al.*, Dynamin-Independent Mechanisms of Endocytosis and Receptor Trafficking. *Cells* **11**, (2022).
28. W. M. Henne *et al.*, FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* **328**, 1281-1284 (2010).
29. H. Ohno *et al.*, Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**, 1872-1875 (1995).
30. S. Höning *et al.*, Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* **18**, 519-531 (2005).
31. M. S. Robinson, Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**, 167-174 (2004).
32. B. M. Collins, A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans, D. J. Owen, Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**, 523-535 (2002).
33. B. T. Kelly *et al.*, A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* **456**, 976-979 (2008).
34. L. Hinrichsen, A. Meyerholz, S. Groos, E. J. Ungewickell, Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8715-8720 (2006).
35. J. Heuser, Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol* **84**, 560-583 (1980).
36. S. Saffarian, E. Cocucci, T. Kirchhausen, Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biol* **7**, e1000191 (2009).
37. T. Kosaka, K. Ikeda, Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J Cell Biol* **97**, 499-507 (1983).
38. P. Wigge *et al.*, Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* **8**, 2003-2015 (1997).
39. S. M. Ferguson *et al.*, Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell* **17**, 811-822 (2009).
40. A. Sundborger *et al.*, An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J Cell Sci* **124**, 133-143 (2011).
41. J. E. Hinshaw, S. L. Schmid, Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192 (1995).
42. P. V. Bashkirov *et al.*, GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell* **135**, 1276-1286 (2008).
43. D. M. Schlossman, S. L. Schmid, W. A. Braell, J. E. Rothman, An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* **99**, 723-733 (1984).
44. E. Ungewickell *et al.*, Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378**, 632-635 (1995).
45. A. P. A. Ferreira *et al.*, Cdk5 and GSK3 β inhibit fast endophilin-mediated endocytosis. *Nat Commun* **12**, 2424 (2021).
46. C. Basquin *et al.*, The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *J Cell Sci* **126**, 1099-1108 (2013).
47. S. Watanabe *et al.*, Synaptojanin and Endophilin Mediate Neck Formation during Ultrafast Endocytosis. *Neuron* **98**, 1184-1197.e1186 (2018).
48. H. F. Renard *et al.*, Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature* **517**, 493-496 (2015).
49. M. Simunovic *et al.*, Friction Mediates Scission of Tubular Membranes Scaffolded by BAR Proteins. *Cell* **170**, 172-184.e111 (2017).
50. S. Yoshida, R. Pacitto, C. Sesi, L. Kotula, J. A. Swanson, Dorsal ruffles enhance activation of Akt by growth factors. *J Cell Sci* **131**, (2018).
51. C. Lamaze *et al.*, Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**, 661-671 (2001).
52. M. Scarselli, J. G. Donaldson, Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. *J Biol Chem* **284**, 3577-3585 (2009).
53. S. Watanabe *et al.*, Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* **504**, 242-247 (2013).

54. E. L. Clayton, G. J. Evans, M. A. Cousin, Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci* **28**, 6627-6632 (2008).
55. M. Murata *et al.*, VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10339-10343 (1995).
56. C. Thiele, M. J. Hannah, F. Fahrenholz, W. B. Huttner, Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* **2**, 42-49 (2000).
57. J. E. Schnitzer, Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* **49**, 265-280 (2001).
58. L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Helenius, Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**, 473-483 (2001).
59. K. G. Rothberg, Y. S. Ying, B. A. Kamen, R. G. Anderson, Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* **111**, 2931-2938 (1990).
60. R. G. Parton, B. Joggerst, K. Simons, Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **127**, 1199-1215 (1994).
61. L. Pelkmans, D. Püntener, A. Helenius, Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-539 (2002).
62. J. R. Henley, E. W. Krueger, B. J. Oswald, M. A. McNiven, Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**, 85-99 (1998).
63. P. Oh, D. P. McIntosh, J. E. Schnitzer, Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141**, 101-114 (1998).
64. H. Radhakrishna, R. D. Klausner, J. G. Donaldson, Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol* **134**, 935-947 (1996).
65. E. Walseng, O. Bakke, P. A. Roche, Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. *J Biol Chem* **283**, 14717-14727 (2008).
66. A. D. Blagoveshchenskaya, L. Thomas, S. F. Feliciangeli, C. H. Hung, G. Thomas, HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* **111**, 853-866 (2002).
67. J. G. Donaldson, Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-41576 (2003).
68. J. J. Thottacherry, M. Sathe, C. Prabhakara, S. Mayor, Spoiled for Choice: Diverse Endocytic Pathways Function at the Cell Surface. *Annu Rev Cell Dev Biol* **35**, 55-84 (2019).
69. J. W. Erickson, R. A. Cerione, Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 153-157 (2001).
70. P. Rossatti *et al.*, Cdc42 Couples T Cell Receptor Endocytosis to GRAF1-Mediated Tubular Invaginations of the Plasma Membrane. *Cells* **8**, (2019).
71. M. Frick *et al.*, Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol* **17**, 1151-1156 (2007).
72. K. Riento, M. Frick, I. Schafer, B. J. Nichols, Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *J Cell Sci* **122**, 912-918 (2009).
73. M. H. Blanchet *et al.*, Cripto recruits Furin and PACE4 and controls Nodal trafficking during proteolytic maturation. *EMBO J* **27**, 2580-2591 (2008).
74. O. O. Glebov, N. A. Bright, B. J. Nichols, Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**, 46-54 (2006).
75. P. W. BRANDT, A study of the mechanism of pinocytosis. *Exp Cell Res* **15**, 300-313 (1958).
76. J. J. Anzinger *et al.*, Native low-density lipoprotein uptake by macrophage colony-stimulating factor-differentiated human macrophages is mediated by macropinocytosis and micropinocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2022-2031 (2010).
77. C. Zhang *et al.*, Calcium- and dynamin-independent endocytosis in dorsal root ganglion neurons. *Neuron* **42**, 225-236 (2004).
78. J. Balaji, M. Armbruster, T. A. Ryan, Calcium control of endocytic capacity at a CNS synapse. *J Neurosci* **28**, 6742-6749 (2008).

79. D. W. Hilgemann, M. Fine, Mechanistic analysis of massive endocytosis in relation to functionally defined surface membrane domains. *J Gen Physiol* **137**, 155-172 (2011).
80. N. Naslavsky, S. Caplan, The enigmatic endosome - sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci* **131**, (2018).
81. S. Corvera, A. D'Arrigo, H. Stenmark, Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 460-465 (1999).
82. T. Kobayashi, F. Gu, J. Gruenberg, Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 517-526 (1998).
83. M. K. Bennett, SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 581-586 (1995).
84. T. Söllner, SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Lett* **369**, 80-83 (1995).
85. T. Kobayashi *et al.*, A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-197 (1998).
86. J. M. Gaullier *et al.*, FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* **394**, 432-433 (1998).
87. T. Kutateladze, M. Overduin, Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science* **291**, 1793-1796 (2001).
88. H. Stenmark, R. Aasland, P. C. Driscoll, The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett* **513**, 77-84 (2002).
89. C. Delevoye, B. Goud, Rab GTPases and kinesin motors in endosomal trafficking. *Methods Cell Biol* **130**, 235-246 (2015).
90. N. Naslavsky, R. Weigert, J. G. Donaldson, Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* **14**, 417-431 (2003).
91. J. Follett, A. Bugarcic, B. M. Collins, R. D. Teasdale, Retromer's Role in Endosomal Trafficking and Impaired Function in Neurodegenerative Diseases. *Curr Protein Pept Sci* **18**, 687-701 (2017).
92. M. N. Seaman, Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* **165**, 111-122 (2004).
93. B. Sönnichsen, S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, M. Zerial, Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* **149**, 901-914 (2000).
94. B. D. Grant, J. G. Donaldson, Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 597-608 (2009).
95. F. R. Maxfield, T. E. McGraw, Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 121-132 (2004).
96. C. N. Arighi, L. M. Hartnell, R. C. Aguilar, C. R. Haft, J. S. Bonifacio, Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* **165**, 123-133 (2004).
97. J. R. van Weering, P. J. Cullen, Membrane-associated cargo recycling by tubule-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol* **31**, 40-47 (2014).
98. M. N. Seaman, H. P. Williams, Identification of the functional domains of yeast sorting nexins Vps5p and Vps17p. *Mol Biol Cell* **13**, 2826-2840 (2002).
99. T. Clairfeuille *et al.*, A molecular code for endosomal recycling of phosphorylated cargos by the SNX27-retromer complex. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 921-932 (2016).
100. F. Steinberg, K. J. Heesom, M. D. Bass, P. J. Cullen, SNX17 protects integrins from degradation by sorting between lysosomal and recycling pathways. *J Cell Biol* **197**, 219-230 (2012).
101. N. Naslavsky, S. Caplan, C-terminal EH-domain-containing proteins: consensus for a role in endocytic trafficking, EH? *J Cell Sci* **118**, 4093-4101 (2005).
102. N. Naslavsky, S. Caplan, EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol* **21**, 122-131 (2011).
103. R. Prekeris, J. Klumperman, Y. A. Chen, R. H. Scheller, Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol* **143**, 957-971 (1998).
104. V. Kreykenbohm, D. Wenzel, W. Antonin, V. Atlachkine, G. F. von Mollard, The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur J Cell Biol* **81**, 273-280 (2002).

105. T. H. Tran, Q. Zeng, W. Hong, VAMP4 cycles from the cell surface to the trans-Golgi network via sorting and recycling endosomes. *J Cell Sci* **120**, 1028-1041 (2007).
106. B. P. Carson, J. M. Del Bas, J. M. Moreno-Navarrete, J. M. Fernandez-Real, S. Mora, The rab11 effector protein FIP1 regulates adiponectin trafficking and secretion. *PLoS One* **8**, e74687 (2013).
107. J. Rahajeng, S. S. Giridharan, N. Naslavsky, S. Caplan, Collapsin response mediator protein-2 (Crmp2) regulates trafficking by linking endocytic regulatory proteins to dynein motors. *J Biol Chem* **285**, 31918-31922 (2010).
108. J. D. Shaw, H. Hama, F. Sohrabi, D. B. DeWald, B. Wendland, PtdIns(3,5)P2 is required for delivery of endocytic cargo into the multivesicular body. *Traffic* **4**, 479-490 (2003).
109. H. Matsuo *et al.*, Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-534 (2004).
110. L. Langemeyer, F. Fröhlich, C. Ungermann, Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. *Trends Cell Biol* **28**, 957-970 (2018).
111. Y. B. Hu, E. B. Dammer, R. J. Ren, G. Wang, The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* **4**, 18 (2015).
112. C. C. Scott, F. Vacca, J. Gruenberg, Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* **31**, 2-10 (2014).
113. E. B. Frankel, A. Audhya, ESCRT-dependent cargo sorting at multivesicular endosomes. *Semin Cell Dev Biol* **74**, 4-10 (2018).
114. A. Hershko, A. Ciechanover, The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**, 761-807 (1992).
115. P. E. Row, I. A. Prior, J. McCullough, M. J. Clague, S. Urbé, The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J Biol Chem* **281**, 12618-12624 (2006).
116. P. A. Vanlandingham, B. P. Ceresa, Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem* **284**, 12110-12124 (2009).
117. M. L. Jongsma *et al.*, SKIP-HOPS recruits TBC1D15 for a Rab7-to-Arl8b identity switch to control late endosome transport. *EMBO J* **39**, e102301 (2020).
118. Q. F. Han *et al.*, Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer* **21**, 207 (2022).
119. D. Wei *et al.*, RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Res* **31**, 157-177 (2021).
120. M. Ostrowski *et al.*, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* **12**, 19-30; sup pp 11-13 (2010).
121. A. A. Alnaas *et al.*, Multivalent lipid targeting by the calcium-independent C2A domain of synaptotagmin-like protein 4/granuphilin. *J Biol Chem* **296**, 100159 (2021).
122. T. Y. Yoon, M. Munson, SNARE complex assembly and disassembly. *Curr Biol* **28**, R397-R401 (2018).
123. A. K. Pfitzner *et al.*, An ESCRT-III Polymerization Sequence Drives Membrane Deformation and Fission. *Cell* **182**, 1140-1155.e1118 (2020).
124. A. R. Huebner *et al.*, Deubiquitylation of Protein Cargo Is Not an Essential Step in Exosome Formation. *Mol Cell Proteomics* **15**, 1556-1571 (2016).
125. J. M. Beekman, P. J. Coffey, The ins and outs of syntenin, a multifunctional intracellular adaptor protein. *J Cell Sci* **121**, 1349-1355 (2008).
126. S. B. Kim *et al.*, Caspase-8 controls the secretion of inflammatory lysyl-tRNA synthetase in exosomes from cancer cells. *J Cell Biol* **216**, 2201-2216 (2017).
127. R. Leblanc *et al.*, Pharmacological inhibition of syntenin PDZ2 domain impairs breast cancer cell activities and exosome loading with syndecan and EpCAM cargo. *J Extracell Vesicles* **10**, e12039 (2020).
128. R. Ghossoub *et al.*, Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun* **5**, 3477 (2014).
129. M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 255-289 (2014).
130. N. C. H. Lau, J. W. P. Yam, From Exosome Biogenesis to Absorption: Key Takeaways for Cancer Research. *Cancers (Basel)* **15**, (2023).

131. L. Mashouri *et al.*, Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer* **18**, 75 (2019).
132. Z. Andreu, M. Yáñez-Mó, Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* **5**, 442 (2014).
133. S. Charrin *et al.*, Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* **420**, 133-154 (2009).
134. M. Yáñez-Mó, O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdés, F. Sánchez-Madrid, Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* **19**, 434-446 (2009).
135. J. M. Escola *et al.*, Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**, 20121-20127 (1998).
136. M. S. Pols, J. Klumperman, Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* **315**, 1584-1592 (2009).
137. G. van Niel *et al.*, The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* **21**, 708-721 (2011).
138. N. Latysheva *et al.*, Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Mol Cell Biol* **26**, 7707-7718 (2006).
139. L. Gräßel *et al.*, The CD63-Syntenin-1 Complex Controls Post-Endocytic Trafficking of Oncogenic Human Papillomaviruses. *Sci Rep* **6**, 32337 (2016).
140. T. Kajimoto *et al.*, Involvement of G $\beta\gamma$ subunits of G. *J Biol Chem* **293**, 245-253 (2018).
141. D. Beillevaire *et al.*, Autolysosomes and caspase-3 control the biogenesis and release of immunogenic apoptotic exosomes. *Cell Death Dis* **13**, 145 (2022).
142. H. Wei *et al.*, Regulation of exosome production and cargo sorting. *Int J Biol Sci* **17**, 163-177 (2021).
143. S. Sharma, M. LeClaire, J. K. Gimzewski, Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. *Nanotechnology* **29**, 132001 (2018).
144. M. Dieudé *et al.*, The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci Transl Med* **7**, 318ra200 (2015).
145. B. Li, M. A. Antonyak, J. Zhang, R. A. Cerione, RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene* **31**, 4740-4749 (2012).
146. V. R. Minciocchi, M. R. Freeman, D. Di Vizio, Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* **40**, 41-51 (2015).
147. J. H. Hurley, ESCRTs are everywhere. *EMBO J* **34**, 2398-2407 (2015).
148. M. Sebbagh *et al.*, Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* **3**, 346-352 (2001).
149. M. Battistelli, E. Falcieri, Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)* **9**, (2020).
150. J. Qin, Q. Xu, Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm* **71**, 537-543 (2014).
151. S. Horibe, T. Tanahashi, S. Kawauchi, Y. Murakami, Y. Rikitake, Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer* **18**, 47 (2018).
152. K. Laulagnier *et al.*, Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cell Mol Life Sci* **75**, 757-773 (2018).
153. A. Gonda, J. Kabagwira, G. N. Senthil, N. R. Wall, Internalization of Exosomes through Receptor-Mediated Endocytosis. *Mol Cancer Res* **17**, 337-347 (2019).
154. S. Munich, A. Sobo-Vujanovic, W. J. Buchser, D. Beer-Stolz, N. L. Vujanovic, Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* **1**, 1074-1083 (2012).
155. D. Fitzner *et al.*, Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* **124**, 447-458 (2011).

156. D. Feng *et al.*, Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* **11**, 675-687 (2010).
157. C. Barrès *et al.*, Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* **115**, 696-705 (2010).
158. A. Nanbo, E. Kawanishi, R. Yoshida, H. Yoshiyama, Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J Virol* **87**, 10334-10347 (2013).
159. M. P. Plebanek *et al.*, Nanoparticle Targeting and Cholesterol Flux Through Scavenger Receptor Type B-1 Inhibits Cellular Exosome Uptake. *Sci Rep* **5**, 15724 (2015).
160. B. S. Joshi, M. A. de Beer, B. N. G. Giepmans, I. S. Zuhorn, Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS Nano* **14**, 4444-4455 (2020).
161. I. Nakase, S. Futaki, Combined treatment with a pH-sensitive fusogenic peptide and cationic lipids achieves enhanced cytosolic delivery of exosomes. *Sci Rep* **5**, 10112 (2015).
162. J. Lee *et al.*, Cellular Engineering with Membrane Fusogenic Liposomes to Produce Functionalized Extracellular Vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 6790-6795 (2016).
163. I. Parolini *et al.*, Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* **284**, 34211-34222 (2009).
164. J. Mercer, M. Schelhaas, A. Helenius, Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* **79**, 803-833 (2010).
165. Z. B. Deng *et al.*, Immature myeloid cells induced by a high-fat diet contribute to liver inflammation. *Hepatology* **50**, 1412-1420 (2009).
166. D. Ha, N. Yang, V. Nadihe, Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* **6**, 287-296 (2016).
167. G. V. Shelke *et al.*, Endosomal signalling via exosome surface TGF β -1. *J Extracell Vesicles* **8**, 1650458 (2019).
168. W. Heusermann *et al.*, Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J Cell Biol* **213**, 173-184 (2016).
169. J. R. Friedman, J. R. Dibenedetto, M. West, A. A. Rowland, G. K. Voeltz, Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *Mol Biol Cell* **24**, 1030-1040 (2013).
170. M. F. Santos *et al.*, VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding protein-related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **293**, 13834-13848 (2018).
171. A. Malhas, C. Goulbourne, D. J. Vaux, The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends Cell Biol* **21**, 362-373 (2011).
172. R. A. Spooner, D. C. Smith, A. J. Easton, L. M. Roberts, J. M. Lord, Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Virology* **3**, 26 (2006).
173. D. E. Murphy *et al.*, Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Exp Mol Med* **51**, 1-12 (2019).
174. T. Tian *et al.*, Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol* **228**, 1487-1495 (2013).
175. T. Tian, Y. Wang, H. Wang, Z. Zhu, Z. Xiao, Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* **111**, 488-496 (2010).
176. S. Gurung, D. Perocheau, L. Touramanidou, J. Baruteau, The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* **19**, 47 (2021).
177. J. Meldolesi, Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* **28**, R435-R444 (2018).
178. D. J. Gibbins, C. Ciaudo, M. Erhardt, O. Voinnet, Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **11**, 1143-1149 (2009).
179. P. de Candia *et al.*, Intracellular modulation, extracellular disposal and serum increase of MiR-150 mark lymphocyte activation. *PLoS One* **8**, e75348 (2013).
180. S. Charrin, S. Jouannet, C. Boucheix, E. Rubinstein, Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci* **127**, 3641-3648 (2014).

181. M. P. Hardy *et al.*, Apoptotic endothelial cells release small extracellular vesicles loaded with immunostimulatory viral-like RNAs. *Sci Rep* **9**, 7203 (2019).
182. E. Cocucci, J. Meldolesi, Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol* **25**, 364-372 (2015).
183. J. M. Yang, S. J. Gould, The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. *Biochem Soc Trans* **41**, 277-282 (2013).
184. R. Crescitelli *et al.*, Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles* **2**, (2013).
185. T. Ihara, T. Yamamoto, M. Sugamata, H. Okumura, Y. Ueno, The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch* **433**, 443-447 (1998).
186. G. Desdín-Micó, M. Mittelbrunn, Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell Adh Migr* **11**, 127-134 (2017).
187. E. Emmanouilidou *et al.*, Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* **30**, 6838-6851 (2010).
188. L. Jiang *et al.*, Exosomes in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Alzheimer's Disease. *Med Sci Monit* **25**, 3329-3335 (2019).
189. V. Mattei *et al.*, Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles. *PLoS One* **4**, e5057 (2009).
190. M. B. Hudson *et al.*, miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **307**, C314-319 (2014).
191. B. W. van Balkom, A. S. Eisele, D. M. Pegtel, S. Bervoets, M. C. Verhaar, Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell Vesicles* **4**, 26760 (2015).
192. D. Nieves Torres, S. H. Lee, Inter-neuronal signaling mediated by small extracellular vesicles: wireless communication? *Front Mol Neurosci* **16**, 1187300 (2023).
193. E. I. Buzas, The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **23**, 236-250 (2023).
194. G. Skogberg *et al.*, Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. *Immunol Cell Biol* **93**, 727-734 (2015).
195. V. Lundberg *et al.*, Thymic exosomes promote the final maturation of thymocytes. *Sci Rep* **6**, 36479 (2016).
196. H. Vincent-Schneider *et al.*, Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *Int Immunol* **14**, 713-722 (2002).
197. C. Théry *et al.*, Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* **3**, 1156-1162 (2002).
198. A. Bobrie, M. Colombo, S. Krumeich, G. Raposo, C. Théry, Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* **1**, (2012).
199. G. Marcoux *et al.*, Platelet EVs contain an active proteasome involved in protein processing for antigen presentation via MHC-I molecules. *Blood* **138**, 2607-2620 (2021).
200. D. G. Saliba *et al.*, Composition and structure of synaptic ectosomes exporting antigen receptor linked to functional CD40 ligand from helper T cells. *Elife* **8**, (2019).
201. K. Choudhuri *et al.*, Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature* **507**, 118-123 (2014).
202. H. D. Phan *et al.*, CD24 and IgM Stimulation of B Cells Triggers Transfer of Functional B Cell Receptor to B Cell Recipients Via Extracellular Vesicles. *J Immunol* **207**, 3004-3015 (2021).
203. F. I. Hawari *et al.*, Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1297-1302 (2004).
204. L. Hofmann *et al.*, The Emerging Role of Exosomes in Diagnosis, Prognosis, and Therapy in Head and Neck Cancer. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
205. G. Chen *et al.*, Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* **560**, 382-386 (2018).

206. A. C. Stenqvist, O. Nagaeva, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson, Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J Immunol* **191**, 5515-5523 (2013).
207. I. S. Okoye *et al.*, MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* **41**, 503 (2014).
208. S. L. Tung *et al.*, Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Sci Rep* **8**, 6065 (2018).
209. M. Xie *et al.*, Immunoregulatory Effects of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Immune Cells. *Front Immunol* **11**, 13 (2020).
210. C. Fu *et al.*, Plasmacytoid dendritic cells cross-prime naive CD8 T cells by transferring antigen to conventional dendritic cells through exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 23730-23741 (2020).
211. S. Balan, N. Bhardwaj, Cross-Presentation of Tumor Antigens Is Ruled by Synaptic Transfer of Vesicles among Dendritic Cell Subsets. *Cancer Cell* **37**, 751-753 (2020).
212. Q. Zhuang *et al.*, Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection. *Nat Commun* **7**, 12623 (2016).
213. K. Bai *et al.*, Placenta-Derived Exosomes as a Modulator in Maternal Immune Tolerance During Pregnancy. *Front Immunol* **12**, 671093 (2021).
214. C. K. Brock *et al.*, Stem cell proliferation is induced by apoptotic bodies from dying cells during epithelial tissue maintenance. *Nat Commun* **10**, 1044 (2019).
215. Y. H. Hur, S. Feng, K. F. Wilson, R. A. Cerione, M. A. Antonyak, Embryonic Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Maintain ESC Stemness by Activating FAK. *Dev Cell* **56**, 277-291.e276 (2021).
216. C. C. Huang, R. Narayanan, S. Alapati, S. Ravindran, Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration. *Biomaterials* **111**, 103-115 (2016).
217. A. Murao, M. Brenner, M. Aziz, P. Wang, Exosomes in Sepsis. *Front Immunol* **11**, 2140 (2020).
218. A. Murao, M. Aziz, H. Wang, M. Brenner, P. Wang, Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis* **26**, 152-162 (2021).
219. W. Li *et al.*, LPS Induces Active HMGB1 Release From Hepatocytes Into Exosomes Through the Coordinated Activities of TLR4 and Caspase-11/GSDMD Signaling. *Front Immunol* **11**, 229 (2020).
220. R. R. Nair *et al.*, LPS-Challenged Macrophages Release Microvesicles Coated With Histones. *Front Immunol* **9**, 1463 (2018).
221. A. De Maio, D. Vazquez, Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock* **40**, 239-246 (2013).
222. H. Sakaki, M. Tsukimoto, H. Harada, Y. Moriyama, S. Kojima, Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. *PLoS One* **8**, e59778 (2013).
223. M. R. Fernando, C. Jiang, G. D. Krzyzanowski, W. L. Ryan, New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One* **12**, e0183915 (2017).
224. N. Sadik *et al.*, Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. *Methods Mol Biol* **1740**, 1-15 (2018).
225. D. G. Meckes, N. Raab-Traub, Microvesicles and viral infection. *J Virol* **85**, 12844-12854 (2011).
226. P. D. Bieniasz, The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* **5**, 550-558 (2009).
227. B. J. Chen, R. A. Lamb, Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology* **372**, 221-232 (2008).
228. M. S. Harrison, T. Sakaguchi, A. P. Schmitt, Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1416-1429 (2010).
229. D. M. Jones, J. McLauchlan, Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles. *J Biol Chem* **285**, 22733-22739 (2010).

230. B. Grigorov *et al.*, A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* **6**, 28 (2009).
231. D. Mazurov, G. Heidecker, D. Derse, The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem* **282**, 3896-3903 (2007).
232. C. Jolly, Q. J. Sattentau, Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol* **81**, 7873-7884 (2007).
233. K. Sato *et al.*, Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* **82**, 1021-1033 (2008).
234. L. J. Costa *et al.*, Interactions between Nef and AIP1 proliferate multivesicular bodies and facilitate egress of HIV-1. *Retrovirology* **3**, 33 (2006).
235. R. Madrid *et al.*, Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity. *J Biol Chem* **280**, 5032-5044 (2005).
236. P. Stumptner-Cuvelette *et al.*, 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**, 4857-4870 (2003).
237. C. Muratori *et al.*, Massive secretion by T cells is caused by HIV Nef in infected cells and by Nef transfer to bystander cells. *Cell Host Microbe* **6**, 218-230 (2009).
238. P. Krejbich-Trotot *et al.*, Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virology* **432**, 432 (2011).
239. D. Frleta *et al.*, HIV-1 infection-induced apoptotic microparticles inhibit human DCs via CD44. *J Clin Invest* **122**, 4685-4697 (2012).
240. M. Guo *et al.*, Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain* **143**, 1476-1497 (2020).
241. H. Asai *et al.*, Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* **18**, 1584-1593 (2015).
242. H. D. White, D. P. Chew, Acute myocardial infarction. *Lancet* **372**, 570-584 (2008).
243. S. C. Kim *et al.*, Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ Res* **105**, 1186-1195 (2009).
244. C. Tian, G. Hu, L. Gao, B. T. Hackfort, I. H. Zucker, Extracellular vesicular MicroRNA-27a* contributes to cardiac hypertrophy in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **143**, 120-131 (2020).
245. X. Huang, R. Qu, J. Ouyang, S. Zhong, J. Dai, An Overview of the Cytoskeleton-Associated Role of PDLIM5. *Front Physiol* **11**, 975 (2020).
246. J. A. Cañas *et al.*, Eosinophil-derived exosomes contribute to asthma remodelling by activating structural lung cells. *Clin Exp Allergy* **48**, 1173-1185 (2018).
247. J. J. O'Shea *et al.*, The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* **66**, 311-328 (2015).
248. S. N. Georas, P. Donohue, M. Connolly, M. E. Wechsler, JAK inhibitors for asthma. *J Allergy Clin Immunol* **148**, 953-963 (2021).
249. C. Salomon *et al.*, Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. *Diabetes* **65**, 598-609 (2016).
250. G. E. Rice *et al.*, The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of Exosomes From First Trimester Trophoblast Cells. *J Clin Endocrinol Metab* **100**, E1280-1288 (2015).
251. N. Jayabalan *et al.*, Adipose Tissue Exosomal Proteomic Profile Reveals a Role on Placenta Glucose Metabolism in Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **104**, 1735-1752 (2019).
252. D. K. Nabariya, R. Pallu, V. R. Yenuganti, Exosomes: The protagonists in the tale of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1874**, 188426 (2020).
253. R. Kalluri, V. S. LeBleu, The biology. *Science* **367**, (2020).
254. L. Ruiz-López *et al.*, The role of exosomes on colorectal cancer: A review. *J Gastroenterol Hepatol* **33**, 792-799 (2018).

255. I. A. Asangani *et al.*, MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* **27**, 2128-2136 (2008).
256. Z. Li *et al.*, Tumor-derived exosomal lnc-Sox2ot promotes EMT and stemness by acting as a ceRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **37**, 3822-3838 (2018).
257. Z. Hussain, J. Nigri, R. Tomasini, The Cellular and Biological Impact of Extracellular Vesicles in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
258. D. Lucchetti *et al.*, Differentiation Affects the Release of Exosomes from Colon Cancer Cells and Their Ability to Modulate the Behavior of Recipient Cells. *Am J Pathol* **187**, 1633-1647 (2017).
259. Z. Huang, M. Yang, Y. Li, F. Yang, Y. Feng, Exosomes Derived from Hypoxic Colorectal Cancer Cells Transfer Wnt4 to Normoxic Cells to Elicit a Prometastatic Phenotype. *Int J Biol Sci* **14**, 2094-2102 (2018).
260. M. Manček-Keber *et al.*, Extracellular vesicle-mediated transfer of constitutively active MyD88. *Blood* **131**, 1720-1729 (2018).
261. W. Olejarz, G. Kubiak-Tomaszewska, A. Chrzanowska, T. Lorenc, Exosomes in Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy in Cancers. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
262. I. Shoucair, F. Weber Mello, J. Jabalee, S. Maleki, C. Garnis, The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Extracellular Vesicles in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
263. J. Ren *et al.*, Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics* **8**, 3932-3948 (2018).
264. Y. Miki *et al.*, CD9-positive exosomes from cancer-associated fibroblasts stimulate the migration ability of scirrhus-type gastric cancer cells. *Br J Cancer* **118**, 867-877 (2018).
265. L. P. Sun *et al.*, Cancer-associated fibroblast-derived exosomal miR-382-5p promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* **42**, 1319-1328 (2019).
266. J. Leca *et al.*, Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. *J Clin Invest* **126**, 4140-4156 (2016).
267. J. Nigri *et al.*, CD9 mediates the uptake of extracellular vesicles from cancer-associated fibroblasts that promote pancreatic cancer cell aggressiveness. *Sci Signal* **15**, eabg8191 (2022).
268. Y. Fuchs, H. Steller, Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 329-344 (2015).
269. Y. Fuchs, H. Steller, Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742-758 (2011).
270. Q. Huang *et al.*, Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* **17**, 860-866 (2011).
271. K. H. Gupta *et al.*, Apoptosis and Compensatory Proliferation Signaling Are Coupled by Crkl-Containing Microvesicles. *Dev Cell* **41**, 674-684.e675 (2017).
272. M. S. Pavlyukov *et al.*, Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer Cell* **34**, 119-135.e110 (2018).
273. B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A. K. Azab, The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* **3**, 83-92 (2015).
274. M. Bartoli *et al.*, VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *FASEB J* **17**, 1562-1564 (2003).
275. G. Zhuang *et al.*, Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J* **31**, 3513-3523 (2012).
276. T. Umezū *et al.*, Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* **124**, 3748-3757 (2014).
277. O. Schillaci *et al.*, Exosomes from metastatic cancer cells transfer amoeboid phenotype to non-metastatic cells and increase endothelial permeability: their emerging role in tumor heterogeneity. *Sci Rep* **7**, 4711 (2017).
278. S. Paget, The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 98-101 (1989).

279. S. Rana, K. Malinowska, M. Zöller, Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* **15**, 281-295 (2013).
280. K. Ohshima *et al.*, Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* **5**, e13247 (2010).
281. A. Hoshino *et al.*, Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329-335 (2015).
282. N. Syn, L. Wang, G. Sethi, J. P. Thiery, B. C. Goh, Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci* **37**, 606-617 (2016).
283. T. H. Kim, H. I. Kim, Y. H. Soung, L. A. Shaw, J. Chung, Integrin (alpha6beta4) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. *Mol Cancer Res* **7**, 1605-1612 (2009).
284. F. T. Liu, G. A. Rabinovich, Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**, 29-41 (2005).
285. J. M. Cousin, M. J. Cloninger, The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
286. C. A. Orozco *et al.*, Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor-stroma crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E3769-E3778 (2018).
287. A. Toti *et al.*, Activated fibroblasts enhance cancer cell migration by microvesicles-mediated transfer of Galectin-1. *J Cell Commun Signal* **15**, 405-419 (2021).
288. C. A. Sánchez *et al.*, Exosomes from bulk and stem cells from human prostate cancer have a differential microRNA content that contributes cooperatively over local and pre-metastatic niche. *Oncotarget* **7**, 3993-4008 (2016).
289. C. Huber *et al.*, Lymphotoxin-beta receptor-dependent genes in lymph node and follicular dendritic cell transcriptomes. *J Immunol* **174**, 5526-5536 (2005).
290. D. H. Kim *et al.*, Exosomal PD-L1 promotes tumor growth through immune escape in non-small cell lung cancer. *Exp Mol Med* **51**, 1-13 (2019).
291. Y. Ning *et al.*, Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response. *Immunol Lett* **199**, 36-43 (2018).
292. C. Jiang, N. Zhang, X. Hu, H. Wang, Tumor-associated exosomes promote lung cancer metastasis through multiple mechanisms. *Mol Cancer* **20**, 117 (2021).
293. M. Yi *et al.*, The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape. *J Hematol Oncol* **13**, 25 (2020).
294. J. Zhou *et al.*, Melanoma-released exosomes directly activate the mitochondrial apoptotic pathway of CD4. *Exp Cell Res* **371**, 364-371 (2018).
295. S. B. Ye *et al.*, Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **5**, 5439-5452 (2014).
296. S. A. Bliss *et al.*, Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res* **76**, 5832-5844 (2016).
297. T. B. Steinbichler *et al.*, Therapy resistance mediated by exosomes. *Mol Cancer* **18**, 58 (2019).
298. K. Moitra, H. Lou, M. Dean, Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* **89**, 491-502 (2011).
299. D. Sousa, R. T. Lima, M. H. Vasconcelos, Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. *Trends Mol Med* **21**, 595-608 (2015).
300. A. N. Böing *et al.*, Active caspase-3 is removed from cells by release of caspase-3-enriched vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 1844-1852 (2013).
301. R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, S. W. Lowe, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-164 (2002).
302. V. N. Ivanov *et al.*, FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol* **23**, 3623-3635 (2003).
303. M. S. Shin *et al.*, Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* **154**, 1785-1791 (1999).

304. S. H. Lee *et al.*, Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res* **59**, 3068-3072 (1999).
305. S. H. Lee *et al.*, Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **18**, 3754-3760 (1999).
306. S. Zhang *et al.*, Exosomes promote cetuximab resistance via the PTEN/Akt pathway in colon cancer cells. *Braz J Med Biol Res* **51**, e6472 (2017).
307. R. W. Yeo *et al.*, Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 336-341 (2013).
308. O. P. B. Wiklander, M. Brennan, J. Lötvall, X. O. Breakefield, S. El Andaloussi, Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med* **11**, (2019).
309. D. Gal, P. C. MacDonald, J. C. Porter, J. W. Smith, E. R. Simpson, Effect of cell density and confluency on cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. *Cancer Res* **41**, 473-477 (1981).
310. J. Li *et al.*, Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **4**, 26883 (2015).
311. C. Théry *et al.*, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* **7**, 1535750 (2018).
312. K. W. Witwer *et al.*, Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* **2**, (2013).
313. B. György *et al.*, Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* **117**, e39-48 (2011).
314. S. A. Melo *et al.*, Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **523**, 177-182 (2015).
315. C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**, Unit 3.22 (2006).
316. A. S. Shet *et al.*, Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* **102**, 2678-2683 (2003).
317. Y. Yuana *et al.*, Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles* **2**, (2013).
318. S. Gurunathan, M. Marash, A. Weinberger, J. E. Gerst, t-SNARE phosphorylation regulates endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 1594-1607 (2002).
319. C. Admyre *et al.*, Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* **179**, 1969-1978 (2007).
320. J. Van Deun *et al.*, The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles* **3**, (2014).
321. R. Wubbolts *et al.*, Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* **278**, 10963-10972 (2003).
322. A. G. Ibrahim, K. Cheng, E. Marbán, Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports* **2**, 606-619 (2014).
323. D. D. Taylor, I. N. Chou, P. H. Black, Isolation of plasma membrane fragments from cultured murine melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **113**, 470-476 (1983).
324. A. N. Böing *et al.*, Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* **3**, (2014).
325. M. L. Alvarez, M. Khosroheidari, R. Kanchi Ravi, J. K. DiStefano, Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* **82**, 1024-1032 (2012).
326. H. G. Lamparski *et al.*, Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods* **270**, 211-226 (2002).
327. A. S. Lawrie, A. Albanan, R. A. Cardigan, I. J. Mackie, P. Harrison, Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* **96**, 206-212 (2009).
328. J. Z. Nordin *et al.*, Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine* **11**, 879-883 (2015).

329. B. J. Tauro *et al.*, Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* **56**, 293-304 (2012).
330. C. Chen *et al.*, Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* **10**, 505-511 (2010).
331. C. Lässer, M. Eldh, J. Lötvall, Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*, e3037 (2012).
332. P. E. Chugh *et al.*, Systemically circulating viral and tumor-derived microRNAs in KSHV-associated malignancies. *PLoS Pathog* **9**, e1003484 (2013).
333. E. Zeringer, T. Barta, M. Li, A. V. Vlassov, Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc* **2015**, 319-323 (2015).
334. P. A. Holme, N. O. Solum, F. Brosstad, M. Røger, M. Abdelnoor, Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* **72**, 666-671 (1994).
335. M. Logozzi *et al.*, High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* **4**, e5219 (2009).
336. R. J. Simpson, S. S. Jensen, J. W. Lim, Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* **8**, 4083-4099 (2008).
337. A. R. Brisson, S. Tan, R. Linares, C. Gounou, N. Arraud, Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study. *Platelets* **28**, 263-271 (2017).
338. U. T. Arasu, K. Härkönen, A. Koistinen, K. Rilla, Correlative light and electron microscopy is a powerful tool to study interactions of extracellular vesicles with recipient cells. *Exp Cell Res* **376**, 149-158 (2019).
339. V. Pospichalova *et al.*, Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *J Extracell Vesicles* **4**, 25530 (2015).
340. N. Arraud *et al.*, Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* **12**, 614-627 (2014).
341. N. Arraud, C. Gounou, D. Turpin, A. R. Brisson, Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry A* **89**, 184-195 (2016).
342. E. van der Pol *et al.*, Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* **8**, 2596-2607 (2010).
343. D. N.-C. R *et al.* (Biomedical Physics & Engineering Express, 2018), vol. Volume: 4, pp. Pages: 065013.
344. R. A. Dragovic *et al.*, Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* **7**, 780-788 (2011).
345. W. Anderson, R. Lane, D. Korbie, M. Trau, Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability. *Langmuir* **31**, 6577-6587 (2015).
346. R. E. Lane, D. Korbie, W. Anderson, R. Vaidyanathan, M. Trau, Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep* **5**, 7639 (2015).
347. F. Urabe *et al.*, Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* **318**, C29-C39 (2020).
348. A. Badhwar, A. S. Haqqani, Biomarker potential of brain-secreted extracellular vesicles in blood in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* **12**, e12001 (2020).
349. S. Bernardi, C. Balbi, Extracellular Vesicles: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Biology (Basel)* **9**, (2020).
350. R. A. Mathai *et al.*, Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. *J Clin Med* **8**, (2019).
351. G. Rossi, M. Ignatiadis, Promises and Pitfalls of Using Liquid Biopsy for Precision Medicine. *Cancer Res* **79**, 2798-2804 (2019).

352. H. Shao *et al.*, Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* **18**, 1835-1840 (2012).
353. M. D. Hade, C. N. Suire, Z. Suo, Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells* **10**, (2021).
354. S. Kamerkar *et al.*, Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* **546**, 498-503 (2017).
355. L. Alvarez-Erviti *et al.*, Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* **29**, 341-345 (2011).
356. J. Yang, X. Zhang, X. Chen, L. Wang, G. Yang, Exosome Mediated Delivery of miR-124 Promotes Neurogenesis after Ischemia. *Mol Ther Nucleic Acids* **7**, 278-287 (2017).
357. K. I. Mentkowski, J. K. Lang, Exosomes Engineered to Express a Cardiomyocyte Binding Peptide Demonstrate Improved Cardiac Retention in Vivo. *Sci Rep* **9**, 10041 (2019).
358. Z. Yuan, K. K. Kolluri, K. H. Gowers, S. M. Janes, TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. *J Extracell Vesicles* **6**, 1265291 (2017).
359. B. Escudier *et al.*, 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 (2005).
360. W. E. O'Malley, B. Achinstein, M. J. Shear, Journal of the National Cancer Institute, Vol. 29, 1962: Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *Nutr Rev* **46**, 389-391 (1988).
361. E. A. Carswell *et al.*, An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670 (1975).
362. B. B. Aggarwal, B. Moffat, R. N. Harkins, Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* **259**, 686-691 (1984).
363. B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, J. H. Kim, Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* **119**, 651-665 (2012).
364. G. D. Wiens, G. W. Glenney, Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev Comp Immunol* **35**, 1324-1335 (2011).
365. U. Gaur, B. B. Aggarwal, Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* **66**, 1403-1408 (2003).
366. C. Dostert, M. Grusdat, E. Letellier, D. Brenner, The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev* **99**, 115-160 (2019).
367. J. L. Bodmer, P. Schneider, J. Tschopp, The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* **27**, 19-26 (2002).
368. Y. Collette, A. Gilles, P. Pontarotti, D. Olive, A co-evolution perspective of the TNFSF and TNFRSF families in the immune system. *Trends Immunol* **24**, 387-394 (2003).
369. A. Bhardwaj, B. B. Aggarwal, Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* **23**, 317-332 (2003).
370. D. Faustman, M. Davis, TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 482-493 (2010).
371. L. Probert, TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* **302**, 2-22 (2015).
372. B. B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756 (2003).
373. M. Croft, C. A. Benedict, C. F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 147-168 (2013).
374. S. von Karstedt, A. Montinaro, H. Walczak, Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* **17**, 352-366 (2017).
375. R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501 (2001).
376. T. Sessler, S. Healy, A. Samali, E. Szegezdi, Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol Ther* **140**, 186-199 (2013).

377. S. M. Park, R. Schickel, M. E. Peter, Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 610-616 (2005).
378. N. Levoine, M. Jean, P. Legembre, CD95 Structure, Aggregation and Cell Signaling. *Front Cell Dev Biol* **8**, 314 (2020).
379. S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* **169**, 1747-1756 (1989).
380. B. C. Trauth *et al.*, Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**, 301-305 (1989).
381. A. Oehm *et al.*, Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* **267**, 10709-10715 (1992).
382. T. Suda, T. Takahashi, P. Golstein, S. Nagata, Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169-1178 (1993).
383. P. Xie, TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J Mol Signal* **8**, 7 (2013).
384. A. Mantovani, M. Locati, A. Vecchi, S. Sozzani, P. Allavena, Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* **22**, 328-336 (2001).
385. J. Inazawa, N. Itoh, T. Abe, S. Nagata, Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* **14**, 821-822 (1992).
386. I. Behrmann, H. Walczak, P. H. Krammer, Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* **24**, 3057-3062 (1994).
387. G. Papoff *et al.*, Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* **274**, 38241-38250 (1999).
388. Q. Fu *et al.*, Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Mol Cell* **61**, 602-613 (2016).
389. J. R. Muppidi *et al.*, Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **13**, 1641-1650 (2006).
390. A. Rossin *et al.*, Identification of a lysine-rich region of Fas as a raft nanodomain targeting signal necessary for Fas-mediated cell death. *Exp Cell Res* **316**, 1513-1522 (2010).
391. T. Sato, S. Irie, S. Kitada, J. C. Reed, FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* **268**, 411-415 (1995).
392. L. Gagnoux-Palacios *et al.*, Cell polarity and adherens junction formation inhibit epithelial Fas cell death receptor signaling. *J Cell Biol* **217**, 3839-3852 (2018).
393. E. Cuppen, S. Nagata, B. Wieringa, W. Hendriks, No evidence for involvement of mouse protein-tyrosine phosphatase-BAS-like Fas-associated phosphatase-1 in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 30215-30220 (1997).
394. T. Takahashi *et al.*, Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* **6**, 1567-1574 (1994).
395. J. R. Orlinick, K. B. Elkon, M. V. Chao, Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *J Biol Chem* **272**, 32221-32229 (1997).
396. J. P. Guégan, P. Legembre, Nonapoptotic functions of Fas/CD95 in the immune response. *FEBS J* **285**, 809-827 (2018).
397. V. Risso *et al.*, Metalloprotease-mediated cleavage of CD95 ligand. *FEBS J* **290**, 3145-3164 (2023).
398. N. Cahuzac *et al.*, Fas ligand is localized to membrane rafts, where it displays increased cell death-inducing activity. *Blood* **107**, 2384-2391 (2006).
399. F. Leithäuser *et al.*, Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* **69**, 415-429 (1993).
400. N. Kayagaki *et al.*, Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* **163**, 1906-1913 (1999).
401. N. Kayagaki *et al.*, Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* **189**, 1451-1460 (1999).

402. T. Suda *et al.*, Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* **154**, 3806-3813 (1995).
403. H. Tsutsui *et al.*, IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol* **157**, 3967-3973 (1996).
404. N. A. Fanger, C. R. Maliszewski, K. Schooley, T. S. Griffith, Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* **190**, 1155-1164 (1999).
405. T. S. Griffith *et al.*, Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* **189**, 1343-1354 (1999).
406. P. A. Kiener *et al.*, Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* **185**, 1511-1516 (1997).
407. W. C. Liles, P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, S. J. Klebanoff, Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* **184**, 429-440 (1996).
408. Y. Koga, A. Matsuzaki, A. Suminoe, H. Hattori, T. Hara, Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res* **64**, 1037-1043 (2004).
409. A. Lepple-Wienhues *et al.*, Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13795-13800 (1999).
410. M. R. Alderson *et al.*, Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* **181**, 71-77 (1995).
411. C. M. Trambas, G. M. Griffiths, Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* **4**, 399-403 (2003).
412. D. R. Green, T. A. Ferguson, The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 917-924 (2001).
413. T. A. Phillips *et al.*, TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* **162**, 6053-6059 (1999).
414. T. A. Ferguson, T. S. Griffith, A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunol Rev* **213**, 228-238 (2006).
415. M. Tanaka *et al.*, Fas ligand in human serum. *Nat Med* **2**, 317-322 (1996).
416. T. De La Motte Rouge *et al.*, Serum CD95L Level Correlates with Tumor Immune Infiltration and Is a Positive Prognostic Marker for Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Mol Cancer Res* **17**, 2537-2548 (2019).
417. M. Malleter *et al.*, CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* **73**, 6711-6721 (2013).
418. S. Tauzin *et al.*, The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol* **9**, e1001090 (2011).
419. A. Poissonnier *et al.*, CD95-Mediated Calcium Signaling Promotes T Helper 17 Trafficking to Inflamed Organs in Lupus-Prone Mice. *Immunity* **45**, 209-223 (2016).
420. H. Hashimoto *et al.*, Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **41**, 657-662 (1998).
421. R. Herrero *et al.*, The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *J Clin Invest* **121**, 1174-1190 (2011).
422. S. I. Abrams, Positive and negative consequences of Fas/Fas ligand interactions in the antitumor response. *Front Biosci* **10**, 809-821 (2005).
423. K. Chakrabandhu *et al.*, An Evolution-Guided Analysis Reveals a Multi-Signaling Regulation of Fas by Tyrosine Phosphorylation and its Implication in Human Cancers. *PLoS Biol* **14**, e1002401 (2016).
424. S. Kleber *et al.*, Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* **13**, 235-248 (2008).
425. S. Tauzin, L. Debure, J. F. Moreau, P. Legembre, CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1261-1277 (2012).
426. J. Drappa, A. K. Vaishnav, K. E. Sullivan, J. L. Chu, K. B. Elkon, Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* **335**, 1643-1649 (1996).

427. G. H. Fisher *et al.*, Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-946 (1995).
428. F. Rieux-Laucat *et al.*, Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**, 1347-1349 (1995).
429. V. C. Canale, C. H. Smith, Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* **70**, 891-899 (1967).
430. F. Rieux-Laucat *et al.*, Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood* **94**, 2575-2582 (1999).
431. J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257 (1972).
432. N. Paweletz, Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 72-75 (2001).
433. J. F. Kerr, History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* **181-182**, 471-474 (2002).
434. H. R. Horvitz, Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* **59**, 1701s-1706s (1999).
435. S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516 (2007).
436. C. H. Yi, J. Yuan, The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Dev Cell* **16**, 21-34 (2009).
437. E. Lomonosova, G. Chinnadurai, BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S2-19 (2008).
438. J. Lopez, S. W. Tait, Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* **112**, 957-962 (2015).
439. C. M. Pfeffer, A. T. K. Singh, Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
440. D. R. Green, F. Llambi, Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, (2015).
441. S. Zaman, R. Wang, V. Gandhi, Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* **55**, 1980-1992 (2014).
442. E. A. Slee *et al.*, Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **144**, 281-292 (1999).
443. Y. Chicheportiche *et al.*, TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 32401-32410 (1997).
444. A. Ashkenazi, V. M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
445. M. E. Peter, P. H. Krammer, The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**, 26-35 (2003).
446. A. Suliman, A. Lam, R. Datta, R. K. Srivastava, Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **20**, 2122-2133 (2001).
447. F. Rubio-Moscardo *et al.*, Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* **106**, 3214-3222 (2005).
448. D. W. Nicholson, Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-1042 (1999).
449. E. M. Creagh, H. Conroy, S. J. Martin, Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* **193**, 10-21 (2003).
450. S. Ruchaud *et al.*, Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J* **21**, 1967-1977 (2002).
451. A. U. Lüthi, S. J. Martin, The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**, 641-650 (2007).
452. X. X. Wang, B. Zhang, R. Xia, Q. Y. Jia, Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **24**, 9601-9614 (2020).
453. D. R. Croft *et al.*, Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol* **168**, 245-255 (2005).

454. R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 231-241 (2008).
455. B. Levkau, B. Herren, H. Koyama, R. Ross, E. W. Raines, Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* **187**, 579-586 (1998).
456. W. Kim, S. Kook, D. J. Kim, C. Teodorof, W. K. Song, The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *J Biol Chem* **279**, 8333-8342 (2004).
457. S. Kook *et al.*, Caspase-dependent cleavage of tensin induces disruption of actin cytoskeleton during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 37-45 (2003).
458. U. Steinhilber *et al.*, Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 4972-4980 (2001).
459. R. L. Dusek *et al.*, The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes. *J Biol Chem* **281**, 3614-3624 (2006).
460. J. D. Lane, M. A. Vergnolle, P. G. Woodman, V. J. Allan, Apoptotic cleavage of cytoplasmic dynein intermediate chain and p150(Glued) stops dynein-dependent membrane motility. *J Cell Biol* **153**, 1415-1426 (2001).
461. M. Mancini *et al.*, Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* **149**, 603-612 (2000).
462. R. Chiu, L. Novikov, S. Mukherjee, D. Shields, A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J Cell Biol* **159**, 637-648 (2002).
463. M. Lowe, J. D. Lane, P. G. Woodman, V. J. Allan, Caspase-mediated cleavage of syntaxin 5 and giantin accompanies inhibition of secretory traffic during apoptosis. *J Cell Sci* **117**, 1139-1150 (2004).
464. J. E. Ricci *et al.*, Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* **117**, 773-786 (2004).
465. M. L. Coleman *et al.*, Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**, 339-345 (2001).
466. M. O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).
467. Y. Feinstein-Rotkopf, E. Arama, Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes. *Apoptosis* **14**, 980-995 (2009).
468. K. Hofmann, The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1113-1128 (1999).
469. S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar, Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* **22**, 526-539 (2015).
470. G. M. Cohen, Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** (Pt 1), 1-16 (1997).
471. R. V. Talanian *et al.*, Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* **272**, 9677-9682 (1997).
472. Y. A. Lazebnik, S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, W. C. Earnshaw, Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347 (1994).
473. S. McComb *et al.*, Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. *Sci Adv* **5**, eaau9433 (2019).
474. A. Eramo *et al.*, CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur J Immunol* **34**, 1930-1940 (2004).
475. B. Chaigne-Delalande, J. F. Moreau, P. Legembre, Rewinding the DISC. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **56**, 9-14 (2008).
476. N. Holler *et al.*, Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* **23**, 1428-1440 (2003).
477. P. Schneider *et al.*, Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem* **272**, 18827-18833 (1997).

478. G. S. Salvesen, S. J. Riedl, Structure of the Fas/FADD complex: a conditional death domain complex mediating signaling by receptor clustering. *Cell Cycle* **8**, 2723-2727 (2009).
479. D. R. Green, Caspase Activation and Inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **14**, (2022).
480. F. C. Kischkel *et al.*, Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**, 5579-5588 (1995).
481. G. Koncz, K. Kerekes, K. Chakrabandhu, A. O. Hueber, Regulating Vav1 phosphorylation by the SHP-1 tyrosine phosphatase is a fine-tuning mechanism for the negative regulation of DISC formation and Fas-mediated cell death signaling. *Cell Death Differ* **15**, 494-503 (2008).
482. K. H. Lee *et al.*, The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* **25**, 1009-1023 (2006).
483. D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, (2015).
484. R. Mandal, J. C. Barrón, I. Kostova, S. Becker, K. Strebhardt, Caspase-8: The double-edged sword. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1873**, 188357 (2020).
485. C. Scaffidi *et al.*, Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* **274**, 22532-22538 (1999).
486. T. Kaufmann, A. Strasser, P. J. Jost, Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ* **19**, 42-50 (2012).
487. A. Strasser, P. J. Jost, S. Nagata, The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**, 180-192 (2009).
488. M. E. Peter *et al.*, The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* **129**, 447-450 (2007).
489. M. R. Alderson *et al.*, Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* **178**, 2231-2235 (1993).
490. B. B. Aggarwal, S. Singh, R. LaPushin, K. Totpal, Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett* **364**, 5-8 (1995).
491. A. Jelaska, J. H. Korn, Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts. *J Cell Physiol* **175**, 19-29 (1998).
492. R. A. Freiberg *et al.*, Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* **108**, 215-219 (1997).
493. J. H. Ahn *et al.*, Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem* **276**, 47100-47106 (2001).
494. T. Kataoka *et al.*, The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* **10**, 640-648 (2000).
495. A. Yamada, R. Arakaki, M. Saito, Y. Kudo, N. Ishimaru, Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front Immunol* **8**, 403 (2017).
496. S. F. Krens, H. P. Spaink, B. E. Snaar-Jagalska, Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett* **580**, 4984-4990 (2006).
497. M. Irmeler *et al.*, Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195 (1997).
498. N. Holler *et al.*, Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**, 489-495 (2000).
499. O. Micheau *et al.*, The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **277**, 45162-45171 (2002).
500. S. Horn *et al.*, Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF- κ B Activation and Cell Survival. *Cell Rep* **19**, 785-797 (2017).
501. D. L. Vaux, J. Silke, IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-297 (2005).
502. A. J. Schile, M. García-Fernández, H. Steller, Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev* **22**, 2256-2266 (2008).

503. A. M. Verhagen *et al.*, Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ* **14**, 348-357 (2007).
504. J. Senft, B. Helfer, S. M. Frisch, Caspase-8 interacts with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility. *Cancer Res* **67**, 11505-11509 (2007).
505. V. Risso, E. Lafont, M. Le Gallo, Therapeutic approaches targeting CD95L/CD95 signaling in cancer and autoimmune diseases. *Cell Death Dis* **13**, 248 (2022).
506. P. Schneider *et al.*, Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* **187**, 1205-1213 (1998).
507. M. Tanaka, T. Itai, M. Adachi, S. Nagata, Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* **4**, 31-36 (1998).
508. L. A. O' Reilly *et al.*, Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* **461**, 659-663 (2009).
509. N. Khadra *et al.*, CD95 triggers Orai1-mediated localized Ca²⁺ entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC) β 2, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19072-19077 (2011).
510. S. P. Cullen *et al.*, Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells. *Mol Cell* **49**, 1034-1048 (2013).
511. S. P. Cullen, S. J. Martin, Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. *Semin Cell Dev Biol* **39**, 26-34 (2015).
512. C. K. Ea, L. Deng, Z. P. Xia, G. Pineda, Z. J. Chen, Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**, 245-257 (2006).
513. H. Li, M. Kobayashi, M. Blonska, Y. You, X. Lin, Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activation. *J Biol Chem* **281**, 13636-13643 (2006).
514. C. Urwyler-Rösselet *et al.*, Functions of the RIP kinase family members in the skin. *Cell Mol Life Sci* **80**, 285 (2023).
515. B. Z. Stanger, P. Leder, T. H. Lee, E. Kim, B. Seed, RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**, 513-523 (1995).
516. D. Ofengeim, J. Yuan, Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 727-736 (2013).
517. O. Micheau, J. Tschopp, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181-190 (2003).
518. M. Lork, K. Verhelst, R. Beyaert, CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF- κ B signaling and cell death: so similar, yet so different. *Cell Death Differ* **24**, 1172-1183 (2017).
519. P. R. Elliott *et al.*, Regulation of CYLD activity and specificity by phosphorylation and ubiquitin-binding CAP-Gly domains. *Cell Rep* **37**, 109777 (2021).
520. L. Griewahn *et al.*, SPATA2 restricts OTULIN-dependent LUBAC activity independently of CYLD. *Cell Rep* **42**, 111961 (2023).
521. F. Gonzalez *et al.*, TRAF2 Sets a threshold for extrinsic apoptosis by tagging caspase-8 with a ubiquitin shutoff timer. *Mol Cell* **48**, 888-899 (2012).
522. E. Goto, F. Tokunaga, Decreased linear ubiquitination of NEMO and FADD on apoptosis with caspase-mediated cleavage of HOIP. *Biochem Biophys Res Commun* **485**, 152-159 (2017).
523. J. L. Connolly, S. A. Green, L. A. Greene, Comparison of rapid changes in surface morphology and coated pit formation of PC12 cells in response to nerve growth factor, epidermal growth factor, and dibutyl cyclic AMP. *J Cell Biol* **98**, 457-465 (1984).
524. A. Wilde *et al.*, EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* **96**, 677-687 (1999).
525. E. C. Beattie, C. L. Howe, A. Wilde, F. M. Brodsky, W. C. Mobley, NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* **20**, 7325-7333 (2000).

526. G. Jékely, H. H. Sung, C. M. Luque, P. Rørth, Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration. *Dev Cell* **9**, 197-207 (2005).
527. S. McLaughlin, D. Murray, Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**, 605-611 (2005).
528. J. M. Haugh, T. Meyer, Active EGF receptors have limited access to PtdIns(4,5)P(2) in endosomes: implications for phospholipase C and PI 3-kinase signaling. *J Cell Sci* **115**, 303-310 (2002).
529. S. Sigismund *et al.*, Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* **15**, 209-219 (2008).
530. T. Sasaki, J. Sasaki, T. Sakai, S. Takasuga, A. Suzuki, The physiology of phosphoinositides. *Biol Pharm Bull* **30**, 1599-1604 (2007).
531. A. Sorkin, M. Von Zastrow, Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 600-614 (2002).
532. L. E. Johannessen, T. Ringerike, J. Molnes, I. H. Madshus, Epidermal growth factor receptor efficiently activates mitogen-activated protein kinase in HeLa cells and Hep2 cells conditionally defective in clathrin-dependent endocytosis. *Exp Cell Res* **260**, 136-145 (2000).
533. S. Hayes, A. Chawla, S. Corvera, TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol* **158**, 1239-1249 (2002).
534. J. E. Slessareva, S. M. Routt, B. Temple, V. A. Bankaitis, H. G. Dohlman, Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* **126**, 191-203 (2006).
535. M. Miaczynska *et al.*, APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* **116**, 445-456 (2004).
536. L. S. Zweifel, R. Kuruvilla, D. D. Ginty, Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* **6**, 615-625 (2005).
537. H. W. Kessels, R. Malinow, Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **61**, 340-350 (2009).
538. Y. Mosesson, G. B. Mills, Y. Yarden, Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 835-850 (2008).
539. W. Schneider-Brachert *et al.*, Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* **21**, 415-428 (2004).
540. D. A. Martin, R. M. Siegel, L. Zheng, M. J. Lenardo, Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* **273**, 4345-4349 (1998).
541. K. Chakrabandhu *et al.*, Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J* **26**, 209-220 (2007).
542. K. Chakrabandhu *et al.*, The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. *Cell Death Differ* **15**, 1824-1837 (2008).
543. X. Qian, T. Karpova, A. M. Sheppard, J. McNally, D. R. Lowy, E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **23**, 1739-1748 (2004).
544. M. Curto, B. K. Cole, D. Lallemand, C. H. Liu, A. I. McClatchey, Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* **177**, 893-903 (2007).
545. S. Fukuhara *et al.*, Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* **10**, 513-526 (2008).
546. M. Lu *et al.*, E-cadherin couples death receptors to the cytoskeleton to regulate apoptosis. *Mol Cell* **54**, 987-998 (2014).
547. A. Jeanes, C. J. Gottardi, A. S. Yap, Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **27**, 6920-6929 (2008).
548. D. B. Stairs *et al.*, Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* **19**, 470-483 (2011).

549. P. Carmeliet *et al.*, Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147-157 (1999).
550. C. Hofmann *et al.*, Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **132**, 587-600 (2007).
551. M. R. Schneider *et al.*, A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. *PLoS One* **5**, e14325 (2010).
552. S. R. Frank, J. H. Bell, M. Frödin, S. H. Hansen, A β PIX-PAK2 complex confers protection against Scrib-dependent and cadherin-mediated apoptosis. *Curr Biol* **22**, 1747-1754 (2012).
553. S. M. Reuver, C. C. Garner, E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton. *J Cell Sci* **111 (Pt 8)**, 1071-1080 (1998).
554. Y. Qin, C. Capaldo, B. M. Gumbiner, I. G. Macara, The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol* **171**, 1061-1071 (2005).
555. V. M. Weaver *et al.*, beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* **2**, 205-216 (2002).
556. T. Igaki, J. C. Pastor-Pareja, H. Aonuma, M. Miura, T. Xu, Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. *Dev Cell* **16**, 458-465 (2009).
557. D. S. Andersen *et al.*, The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature* **522**, 482-486 (2015).
558. R. Reinehr, D. Graf, D. Häussinger, Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* **125**, 839-853 (2003).
559. L. Qiao *et al.*, Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell* **12**, 2629-2645 (2001).
560. N. L. Ta, K. Chakrabandhu, S. Huault, A. O. Hueber, The tyrosine phosphorylated pro-survival form of Fas intensifies the EGF-induced signal in colorectal cancer cells through the nuclear EGFR/STAT3-mediated pathway. *Sci Rep* **8**, 12424 (2018).
561. J. P. Steinbach, P. Supra, H. J. Huang, W. K. Cavenee, M. Weller, CD95-mediated apoptosis of human glioma cells: modulation by epidermal growth factor receptor activity. *Brain Pathol* **12**, 12-20 (2002).
562. K. Seyrek, I. N. Lavrik, Modulation of CD95-mediated signaling by post-translational modifications: towards understanding CD95 signaling networks. *Apoptosis* **24**, 385-394 (2019).
563. A. O. Hueber, A. M. Bernard, Z. Herincs, A. Couzinet, H. T. He, An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* **3**, 190-196 (2002).
564. A. O. Hueber, Role of membrane microdomain rafts in TNFR-mediated signal transduction. *Cell Death Differ* **10**, 7-9 (2003).
565. F. Henkler *et al.*, The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol* **168**, 1087-1098 (2005).
566. M. Miyaji *et al.*, Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* **202**, 249-259 (2005).
567. C. Gajate *et al.*, Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* **200**, 353-365 (2004).
568. C. Feig, V. Tchikov, S. Schütze, M. E. Peter, Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J* **26**, 221-231 (2007).
569. A. Rossin *et al.*, Fas palmitoylation by the palmitoyl acyltransferase DHHC7 regulates Fas stability. *Cell Death Differ* **22**, 643-653 (2015).

570. A. Rossin, M. Derouet, F. Abdel-Sater, A. O. Hueber, Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *Biochem J* **419**, 185-192, 182 p following 192 (2009).
571. V. Anathy *et al.*, Redox amplification of apoptosis by caspase-dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas. *J Cell Biol* **184**, 241-252 (2009).
572. L. Leon-Bolotte *et al.*, S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* **140**, 2009-2018, 2018.e2001-2004 (2011).
573. O. M. Shatnyeva *et al.*, Modulation of the CD95-induced apoptosis: the role of CD95 N-glycosylation. *PLoS One* **6**, e19927 (2011).
574. Y. H. Zeidan, Y. A. Hannun, The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. *Curr Mol Med* **10**, 454-466 (2010).
575. T. S. Tirodkar, C. Voelkel-Johnson, Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol* **34**, 231-242 (2012).
576. M. Stephan *et al.*, Role of caspases in CD95-induced biphasic activation of acid sphingomyelinase. *Oncotarget* **8**, 20067-20085 (2017).
577. Y. H. Zeidan, Y. A. Hannun, Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **282**, 11549-11561 (2007).
578. E. Gulbins, H. Grassmé, Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 139-145 (2002).
579. M. Sawada *et al.*, Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Exp Cell Res* **273**, 157-168 (2002).
580. B. Edelmann *et al.*, Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *EMBO J* **30**, 379-394 (2011).
581. M. Watanabe *et al.*, Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. *Cancer Res* **64**, 1000-1007 (2004).
582. R. S. Faustino *et al.*, Ceramide regulation of nuclear protein import. *J Lipid Res* **49**, 654-662 (2008).
583. M. E. Guicciardi, M. Leist, G. J. Gores, Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**, 2881-2890 (2004).
584. C. A. Dumitru, I. E. Sandalcioglu, M. Wagner, M. Weller, E. Gulbins, Lysosomal ceramide mediates gemcitabine-induced death of glioma cells. *J Mol Med (Berl)* **87**, 1123-1132 (2009).
585. O. Cuvillier *et al.*, Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**, 800-803 (1996).
586. T. G. Cross *et al.*, Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* **256**, 34-41 (2000).
587. Z. Xia, M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, M. E. Greenberg, Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-1331 (1995).
588. S. An, Y. Zheng, T. Bleu, Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem* **275**, 288-296 (2000).
589. Y. G. Kwon *et al.*, Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem* **276**, 10627-10633 (2001).
590. E. J. Goetzl, Y. Kong, B. Mei, Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax. *J Immunol* **162**, 2049-2056 (1999).
591. E. J. Dickson, Phosphoinositide transport and metabolism at membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1867**, 159107 (2022).
592. Y. Posor, W. Jang, V. Haucke, Phosphoinositides as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 797-816 (2022).
593. A. Rossin *et al.*, The Btk-dependent PIP5K1γ lipid kinase activation by Fas counteracts FasL-induced cell death. *Apoptosis* **22**, 1344-1352 (2017).

594. R. A. Franklin, J. A. McCubrey, Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* **14**, 2019-2034 (2000).
595. E. Charlier *et al.*, SHIP-1 inhibits CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis in primary T lymphocytes and T leukemic cells by promoting CD95 glycosylation independently of its phosphatase activity. *Leukemia* **24**, 821-832 (2010).
596. J. P. Shaw *et al.*, Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205 (1988).
597. A. Krueger, S. C. Fas, S. Baumann, P. H. Krammer, The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* **193**, 58-69 (2003).
598. L. Zheng, J. Li, M. Lenardo, Restimulation-induced cell death: new medical and research perspectives. *Immunol Rev* **277**, 44-60 (2017).
599. S. T. Ju *et al.*, Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**, 444-448 (1995).
600. M. Dudek *et al.*, Author Correction: Auto-aggressive CXCR6. *Nature* **593**, E14 (2021).
601. M. Hahne *et al.*, Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur J Immunol* **26**, 721-724 (1996).
602. S. Nagata, M. Tanaka, Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol* **17**, 333-340 (2017).
603. M. Rescigno *et al.*, Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* **192**, 1661-1668 (2000).
604. P. B. Stranges *et al.*, Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* **26**, 629-641 (2007).
605. S. Kim *et al.*, Dynamic Fas signaling network regulates neural stem cell proliferation and memory enhancement. *Sci Adv* **6**, eaaz9691 (2020).
606. C. Lambert, A. M. Landau, J. Desbarats, Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* **8**, 551-562 (2003).
607. H. J. Kaplan, M. A. Leibole, T. Tezel, T. A. Ferguson, Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med* **5**, 292-297 (1999).
608. K. Seyrek, N. V. Ivanisenko, F. Wohlfromm, J. Espe, I. N. Lavrik, Impact of human CD95 mutations on cell death and autoimmunity: a model. *Trends Immunol* **43**, 22-40 (2022).
609. M. Del-Rey *et al.*, A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **108**, 1306-1312 (2006).
610. M. S. Lim *et al.*, Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol* **153**, 1541-1550 (1998).
611. J. C. Turbyville, V. K. Rao, The autoimmune lymphoproliferative syndrome: A rare disorder providing clues about normal tolerance. *Autoimmun Rev* **9**, 488-493 (2010).
612. S. Price *et al.*, Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood* **123**, 1989-1999 (2014).
613. S. Poppema, E. Maggio, A. van den Berg, Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leuk Lymphoma* **45**, 423-431 (2004).
614. D. Perry, A. Sang, Y. Yin, Y. Y. Zheng, L. Morel, Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 271694 (2011).
615. M. E. Maccari *et al.*, Revisiting autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by Fas ligand mutations. *J Allergy Clin Immunol* **151**, 1391-1401.e1397 (2023).
616. S. D. D'Souza *et al.*, Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* **184**, 2361-2370 (1996).
617. N. Ishimaru *et al.*, Possible role of organ-specific autoantigen for Fas ligand-mediated activation-induced cell death in murine Sjögren's syndrome. *J Immunol* **167**, 6031-6037 (2001).
618. P. M. Trivedi *et al.*, Soluble FAS ligand is not required for pancreatic islet inflammation or beta-cell destruction in non-obese diabetic mice. *Cell Death Discov* **5**, 136 (2019).
619. B. Božič, B. Rozman, Apoptosis and Autoimmunity. *EJIFCC* **17**, 69-74 (2006).
620. L. Chen *et al.*, CD95 promotes tumour growth. *Nature* **465**, 492-496 (2010).

621. E. J. Steller *et al.*, The death receptor CD95 activates the cofilin pathway to stimulate tumour cell invasion. *EMBO Rep* **12**, 931-937 (2011).
622. T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, I. L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111 (2001).
623. M. Richards, S. P. Tan, J. H. Tan, W. K. Chan, A. Bongso, The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* **22**, 51-64 (2004).
624. N. S. Corsini *et al.*, The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair. *Cell Stem Cell* **5**, 178-190 (2009).
625. H. Zheng *et al.*, Glycogen synthase kinase-3 beta regulates Snail and β -catenin expression during Fas-induced epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* **49**, 2734-2746 (2013).
626. S. M. Park, A. B. Gaur, E. Lengyel, M. E. Peter, The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* **22**, 894-907 (2008).
627. P. Ceppi *et al.*, CD95 and CD95L promote and protect cancer stem cells. *Nat Commun* **5**, 5238 (2014).
628. J. R. Podojil, S. D. Miller, Targeting the B7 family of co-stimulatory molecules: successes and challenges. *BioDrugs* **27**, 1-13 (2013).
629. M. Y. Ho *et al.*, Combination of FasL and GM-CSF confers synergistic antitumor immunity in an in vivo model of the murine Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer* **123**, 123-133 (2008).
630. H. H. Backus *et al.*, 5-Fluorouracil induced Fas upregulation associated with apoptosis in liver metastases of colorectal cancer patients. *Ann Oncol* **12**, 209-216 (2001).
631. C. Cui *et al.*, Neutrophil elastase selectively kills cancer cells and attenuates tumorigenesis. *Cell* **184**, 3163-3177.e3121 (2021).
632. G. C *et al.* (Cancer Research, 2016), pp. 76: 464. 298.
633. B. O. Tschumi *et al.*, Correction to: CART cells are prone to Fas- and DR5-mediated cell death. *J Immunother Cancer* **6**, 92 (2018).
634. S. K. Oda *et al.*, A Fas-4-1BB fusion protein converts a death to a pro-survival signal and enhances T cell therapy. *J Exp Med* **217**, (2020).
635. J. B. Oliveira *et al.*, Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* **116**, e35-40 (2010).
636. T. K. Owonikoko *et al.*, Soluble FAS ligand as a biomarker of disease recurrence in differentiated thyroid cancer. *Cancer* **119**, 1503-1511 (2013).
637. M. Drachsler *et al.*, CD95 maintains stem cell-like and non-classical EMT programs in primary human glioblastoma cells. *Cell Death Dis* **7**, e2209 (2016).
638. A. J. Abusamra *et al.*, Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* **35**, 169-173 (2005).
639. N. F. Chi *et al.*, Hyperglycemia-related FAS gene and hsa-let-7b-5p as markers of poor outcomes for ischaemic stroke. *Eur J Neurol* **27**, 1647-1655 (2020).
640. M. F. Baietti *et al.*, Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* **14**, 677-685 (2012).
641. P. P. Manna, W. A. Frazier, The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein kinase A. *J Immunol* **170**, 3544-3553 (2003).
642. M. Missotten, A. Nichols, K. Rieger, R. Sadoul, Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ* **6**, 124-129 (1999).
643. P. Vito, L. Pellegrini, C. Guiet, L. D'Adamio, Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca²⁺-dependent reaction. *J Biol Chem* **274**, 1533-1540 (1999).
644. C. Chatellard-Causse *et al.*, Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem* **277**, 29108-29115 (2002).

645. C. Géminard, A. De Gassart, L. Blanc, M. Vidal, Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic* **5**, 181-193 (2004).
646. E. J. Brown, W. A. Frazier, Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* **11**, 130-135 (2001).
647. J. M. Green *et al.*, Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* **146**, 673-682 (1999).
648. J. F. McDonald, A. Zheleznyak, W. A. Frazier, Cholesterol-independent interactions with CD47 enhance alphavbeta3 avidity. *J Biol Chem* **279**, 17301-17311 (2004).
649. M. Ticchioni *et al.*, Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow. *FASEB J* **15**, 341-350 (2001).
650. Z. Li *et al.*, Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol* **157**, 509-519 (2002).
651. R. D. Pettersen, K. Hestdal, M. K. Olafsen, S. O. Lie, F. P. Lindberg, CD47 signals T cell death. *J Immunol* **162**, 7031-7040 (1999).
652. R. D. Pettersen, CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis* **5**, 299-306 (2000).
653. P. A. Oldenborg *et al.*, Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* **288**, 2051-2054 (2000).
654. B. R. Blazar *et al.*, CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med* **194**, 541-549 (2001).
655. P. A. Oldenborg, H. D. Gresham, Y. Chen, S. Izui, F. P. Lindberg, Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* **99**, 3500-3504 (2002).
656. D. Camerini, G. Walz, W. A. Loenen, J. Borst, B. Seed, The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol* **147**, 3165-3169 (1991).
657. F. K. Chan, Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* **37**, 101-107 (2007).
658. P. Ramakrishnan, W. Wang, D. Wallach, Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* **21**, 477-489 (2004).
659. H. Akiba *et al.*, CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* **273**, 13353-13358 (1998).
660. S. L. Buchan, A. Rogel, A. Al-Shamkhani, The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy. *Blood* **131**, 39-48 (2018).
661. P. P. Manna, J. Dimitry, P. A. Oldenborg, W. A. Frazier, CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 29637-29644 (2005).
662. W. A. Frazier *et al.*, The thrombospondin receptor integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi. *J Biol Chem* **274**, 8554-8560 (1999).
663. C. V. Carman, T. A. Springer, Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* **15**, 547-556 (2003).
664. S. Nagata, Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* **33**, 29-55 (1999).
665. M. P. Chao *et al.*, Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* **142**, 699-713 (2010).
666. R. Majeti *et al.*, CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* **138**, 286-299 (2009).
667. S. B. Willingham *et al.*, The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6662-6667 (2012).
668. P. P. Manna, W. A. Frazier, CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A. *Cancer Res* **64**, 1026-1036 (2004).

669. V. Mateo *et al.*, Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization. *Blood* **100**, 2882-2890 (2002).
670. U. Johansson, K. Higginbottom, M. Londei, CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells. *Scand J Immunol* **59**, 40-49 (2004).
671. M. M. Xie *et al.*, An agonistic anti-signal regulatory protein α antibody for chronic inflammatory diseases. *Cell Rep Med* **4**, 101130 (2023).
672. M. E. W. Logtenberg, F. A. Scheeren, T. N. Schumacher, The CD47-SIRP α Immune Checkpoint. *Immunity* **52**, 742-752 (2020).
673. R. M. Brightwell *et al.*, The CD47 "don't eat me signal" is highly expressed in human ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **143**, 393-397 (2016).
674. C. H. Takimoto *et al.*, The Macrophage 'Do not eat me' signal, CD47, is a clinically validated cancer immunotherapy target. *Ann Oncol* **30**, 486-489 (2019).
675. H. Liénard, P. Bruhns, O. Malbec, W. H. Fridman, M. Daëron, Signal regulatory proteins negatively regulate immunoreceptor-dependent cell activation. *J Biol Chem* **274**, 32493-32499 (1999).
676. S. Dehmani *et al.*, SIRP γ -CD47 Interaction Positively Regulates the Activation of Human T Cells in Situation of Chronic Stimulation. *Front Immunol* **12**, 732530 (2021).
677. T. Kobata, K. Agematsu, J. Kameoka, S. F. Schlossman, C. Morimoto, CD27 is a signal-transducing molecule involved in CD45RA⁺ naive T cell costimulation. *J Immunol* **153**, 5422-5432 (1994).
678. T. Kobata *et al.*, CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11249-11253 (1995).
679. A. DeBarros, M. Chaves-Ferreira, F. d'Orey, J. C. Ribot, B. Silva-Santos, CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human $\gamma\delta$ peripheral blood lymphocytes. *Eur J Immunol* **41**, 195-201 (2011).
680. V. Ramakrishna *et al.*, Characterization of the human T cell response to in vitro CD27 costimulation with varlilumab. *J Immunother Cancer* **3**, 37 (2015).
681. S. M. Lens, K. Tesselaar, M. H. van Oers, R. A. van Lier, Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol* **10**, 491-499 (1998).
682. T. Ahrends *et al.*, CD27 Agonism Plus PD-1 Blockade Recapitulates CD4⁺ T-cell Help in Therapeutic Anticancer Vaccination. *Cancer Res* **76**, 2921-2931 (2016).
683. L. Z. He *et al.*, Agonist anti-human CD27 monoclonal antibody induces T cell activation and tumor immunity in human CD27-transgenic mice. *J Immunol* **191**, 4174-4183 (2013).
684. J. Diegmann *et al.*, Identification of CD70 as a diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Eur J Cancer* **41**, 1794-1801 (2005).
685. K. Junker *et al.*, CD70: a new tumor specific biomarker for renal cell carcinoma. *J Urol* **173**, 2150-2153 (2005).
686. M. C. Ryan *et al.*, Targeting pancreatic and ovarian carcinomas using the auristatin-based anti-CD70 antibody-drug conjugate SGN-75. *Br J Cancer* **103**, 676-684 (2010).
687. J. Wischhusen *et al.*, Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res* **62**, 2592-2599 (2002).
688. C. Cormary, R. Gonzalez, J. C. Faye, G. Favre, A. F. Tilkin-Mariamé, Induction of T-cell antitumor immunity and protection against tumor growth by secretion of soluble human CD70 molecules. *Cancer Gene Ther* **11**, 497-507 (2004).
689. J. Miller *et al.*, Soluble CD70: a novel immunotherapeutic agent for experimental glioblastoma. *J Neurosurg* **113**, 280-285 (2010).
690. C. Claus *et al.*, CD27 signaling increases the frequency of regulatory T cells and promotes tumor growth. *Cancer Res* **72**, 3664-3676 (2012).
691. K. P. van Gisbergen *et al.*, Protective CD8 T cell memory is impaired during chronic CD70-driven costimulation. *J Immunol* **182**, 5352-5362 (2009).
692. M. W. Makgoba *et al.*, ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* **331**, 86-88 (1988).

693. C. Blank, T. F. Gajewski, A. Mackensen, Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 307-314 (2005).
694. C. Blank, A. Mackensen, Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 739-745 (2007).
695. Y. Iwai *et al.*, Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12293-12297 (2002).
696. R. L. Johnson *et al.*, Immune Checkpoint Inhibitors Targeting the PD-1/PD-L1 Pathway in Advanced, Recurrent Endometrial Cancer: A Scoping Review with SWOT Analysis. *Cancers (Basel)* **15**, (2023).