

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « *Immunologie* »

Par

Mélanie LANCIEN

Etude du rôle des gènes homologues *Tmem176a* et *Tmem176b* dans le système immunitaire : immunité de type 17 et biologie des cellules dendritiques

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 15/10/19
Unité de recherche : CRTI UMR1064 INSERM
Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Bénédicte Manoury DR2 U1151-CNRS UMR 8253 Paris
Philippe Pierre DR1 CIML Marseille

Composition du Jury :

Président:	Régis Josien	Professeur CRTI UMR1064 INSERM Nantes
Examineurs :	Gaëlle Boncompain	CR2 CNRS UMR 144 Paris
	Régis Josien	Professeur CRTI UMR1064 INSERM Nantes
Dir. de thèse :	Cédric Louvet	Chercheur CRTI UMR1064 INSERM Nantes
Co-dir. de thèse :	Maria Cristina Cuturi	DR2 CRTI UMR1064 INSERM Nantes

*"Le commencement de toute les sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont."*

Aristote

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Bénédicte Manoury et Philippe Pierre d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour vos conseils lors de la correction de ce mémoire.

Je remercie Gaëlle Boncompain et Régis Josien d'avoir accepté d'être les examinateurs lors de la soutenance de ma thèse.

Je remercie également Susan Chan et Arnaud Boureille d'avoir participé aux comités de suivi de thèse au cours de ces trois ans.

Je remercie Régis Josien, en tant que directeur du CRTI et chef de l'équipe 1, de m'avoir accueillie au laboratoire pour réaliser cette thèse.

Je remercie sincèrement Maria Cristina Cuturi et Cédric Louvet de m'avoir permis d'intégrer leur équipe lors de mon stage de master 1 et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci Cristina pour vos encouragements et vos conseils tout au long de ces trois ans. Un merci très particulier à Cédric pour ton aide, ta confiance et la bienveillance dont tu as fait preuve depuis que je suis arrivée dans ton équipe. Merci pour toutes ces discussions (parfois pendant plusieurs heures), parlé d'immunologie avec toi est un vrai bonheur et surtout elles m'ont permis de grandir scientifiquement. Ton soutien sans faille pendant ces trois ans m'a permis de prendre confiance et de me dépasser. Un grand merci pour m'avoir accompagnée et avoir permis que cette thèse soit avant tout un plaisir. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour l'avenir, j'espère que tes projets se concrétiseront.

J'ai eu la chance inestimable d'intégrer une équipe formidable pour ma thèse. Alors merci aux différentes personnes qui ont fait partie de cette équipe et qui se sont succédées au cours de ces trois ans. D'abord, Aurélie Lemoine, qui m'a formée à mes débuts en master. Puis Géraldine et Lucile, je n'aurai pas pu espérer avoir de meilleures collègues à mes débuts en thèse. Géraldine, tu as su être à l'écoute, me donner des conseils et toujours m'encourager. C'était un plaisir de faire des manip avec toi. WW alias Lucile, je ne pensais pas en débutant cette thèse j'aurai la chance de travailler avec une collègue aussi formidable

que toi. Tu as été d'une aide précieuse, bien sur dans les manips, mais surtout en devenant une amie et un soutien. En ce qui concerne le chant, il va falloir qu'on s'améliore encore... J'ai également appris énormément en étant à vos côtés, alors merci pour tout.

Plus récemment Manu et Sonia, vous avez rejoint notre équipe. Merci pour votre aide et votre bonne humeur. Manu j'espère que tu ne seras pas trop traumatisé...

En plus d'intégrer une équipe formidable, j'ai eu la chance d'intégrer un bureau exceptionnel. Apo, Eugénie, Gwen, Justine, Sabrina, Séverine, Steph, puis Johanna et Nathan. Je suis arrivée dans ce bureau au cours de mon master 2. A l'époque, je n'avais pas encore mesuré à quel point j'étais chanceuse de faire partie de votre bureau. Mais très vite j'ai compris que vous seriez d'une bonne humeur, d'une générosité, d'un soutien et d'une écoute sans faille tout au long de ces trois années. Vous avez été un pilier durant cette thèse. Je ne suis pas sûre que ces mots seront à la hauteur de ces années passées à vos côtés mais sachez que ce fut un vrai bonheur de faire partie des vôtres. Evidemment si on fait abstraction de mon addiction au sucre (merci aux petits dej du vendredi et à tous les autres jours de la semaine...). Merci également pour tous les conseils que j'ai eu sur les enfants...

Amandine, on a débuté notre thèse ensemble et on la finit ensemble. Tu as été d'un soutien indéfectible, en particulier au cours de cette dernière année et de la rédaction de ce mémoire. Nous nous sommes encouragées et soutenues. Tu as su être à l'écoute quand j'en ai eu besoin. Et surtout, on a partagé tant de bons moments grâce à ta bonne humeur constante. Merci pour tout.

Ce qui est certain, c'est que cette thèse ne se serait pas déroulée aussi bien sans tous ces vendredis soirs (et souvent d'autres jours dans la semaine...) avec vous, « le groupe du bootlegger » : Antoine, Léa, Laetitia, Lola, Séverine et JN, Justine, Delphine, Eros.

Chacun de vous, à votre manière, avez égayé mes journées au labo et fait de ces soirées des moments mémorables. Antoine, merci pour ton soutien et tes encouragements. On a partagé beaucoup de bons moments, parfois des moments plus stressants, mais on a toujours su se soutenir. On en a fait du chemin depuis nos pauses sur la terrasse en M1 et M2! Léa, j'ai passé une semaine au top à Boston, à l'image de ces cinq ans passés en ta compagnie. Merci à vous deux pour tous ces moments partagés, pour discuter, pour

décompresser et surtout pour rigoler. Vos qualités de chanteurs me manqueront... Nous avons commencé tous les quatre en master 1, Amandine, Antoine, Léa. Je vous souhaite à tous les trois, le meilleur pour vos projets futurs.

Laetitia, malgré des tensions, je pense que finalement nous avons réussi à trouver un terrain d'entente (je vais graver mon nom à ma place de vélo avant de partir). Merci pour ta bonne humeur et ton aide (surtout pour toutes les questions que je t'ai posé pour ce mémoire). Lola, merci pour ta gentillesse à toute épreuve et ton soutien. Je vous souhaite le meilleur à Guillaume et à toi pour vos nouvelles aventures. Eros, salut, salut, tu as égayé nos soirées du vendredi avec tes histoires parfois surprenantes et tes discussions. Bonne chance pour cette nouvelle aventure à Oxford. Séverine et Justine, au bureau, en soirées, au sport, vous étiez partout durant ces trois ans. Merci pour tout, pour votre bonne humeur, votre soutien, nos discussions, nos tête-à-tête Séverine, tard le soir. Merci également à JN qui a supporté nos conversations labo en soirée... Delphine, l'aventurière du groupe et membre du clan des bretonnes, merci pour tous ces bons moments passés ensemble. J'aimerais par ces remerciements vous montrer à quel point vous avez été importants durant ces trois ans, merci pour tout.

Un merci spécial à Kévin et Thomas du Bootlegger pour vos fabuleux cocktails et pour tous ces vendredis passés dans votre bar.

Merci à toute l'équipe 1 pour vos conseils et votre aide, notamment au cours des réunions du mercredi. Un merci particulier à Laurence et Flora pour votre bonne humeur et votre bienveillance. Claire et Manu, ce fut un vrai plaisir de travailler avec vous. Merci pour votre bonne humeur constante. Merci à vous tous pour toutes ces conversations, souvent dans les couloirs, qui semblent anodines mais qui ont contribué à faire de cette thèse une très belle aventure.

Merci à l'ensemble des personnes du laboratoire pour ces trois ans passés à vos côtés. Vous avez tous votre place dans ces remerciements. Un merci particulier à Laurent, pour ta bonne humeur et tes blagues.

Il est certain que sans vous jamais je ne serai arrivée jusqu'à cette thèse, merci à toute ma famille. Merci à mes parents, pour m'avoir toujours soutenu et encouragé, c'est grâce à vous

qu'aujourd'hui je vais soutenir cette thèse. Vous avez toujours su être là quand j'en avais besoin pour me rassurer et la fierté que je vois en vous quand je parle du labo est la plus belle des récompenses. Je n'aurai jamais pu écrire cette thèse ailleurs que chez moi, merci pour cet été. Vous avez su m'encourager, être présents, tout en me laissant l'espace dont j'avais besoin pour écrire. Marie, ma grande soeur, ma meilleure amie, notre relation si fusionnelle, ton soutien quotidien m'ont tellement aidé au cours de ces trois ans. On a toujours été présente l'une pour l'autre, ensemble à Brest et maintenant à distance. Et même si des milliers de km nous sépareront peut-être bientôt je sais qu'on restera toujours aussi proche. Clin d'oeil à mon beau-frère, Jérôme, tu as su te faire une place dans notre famille (mais n'en abuse pas trop!). Merci également à mes grands-parents et à Fabienne, pour votre soutien et vos encouragements. Merci pour les repas du samedi midi, un retour aux sources tellement agréable. Merci à toute ma famille et je suis très fier de bientôt soutenir cette thèse devant vous. Entre nous, il n'y a pas besoin de se parler pour savoir que nous comptons les uns aux autres. Mais, tout de même, sachez que vous êtes les personnes qui comptent le plus pour moi.

Merci à toutes les autres personnes qui ont compté pour moi au cours de ces trois ans, en particulier Mel B pour toutes soirées (souvent jusqu'à pas d'heure!). Je remercie également Monique Martin, mon institutrice de CM1, qui a eu la gentillesse de corriger ce mémoire.

Etonnamment, l'écriture de ces remerciements a été pour moi plus difficile que je le pensais. Non pas que je ne savais pas quoi dire, bien au contraire, mais parce que je ne trouvais pas les mots justes pour exprimer à quel point chacun de vous, à votre manière, avez fait de ces trois une aventure formidable. Alors simplement, merci à vous tous.

Sommaire

Introduction.....	15
A. L'immunité de type 17	19
1. La réponse immunitaire adaptative : les lymphocytes T.....	19
2. Le paradigme Th1/Th2	20
3. Identification de l'IL-23 et des cellules Th17	21
4. Le facteur de transcription ROR γ t.....	22
5. ROR γ t est le facteur de transcription induisant les Th17	24
6. Différenciation des Th17 <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	26
7. La famille de l'immunité de type 17	29
7.1. Identification d'un nouveau type cellulaire : les ILC	29
7.2. Les ILC3, l'équivalent inné des Th17	31
7.3. Les cellules T $\gamma\delta$ 17	32
7.4. Les cellules iNKT17	33
7.5. Les cellules Tc17 : des lymphocytes T CD8 ⁺ producteurs d'IL-17.....	34
8. Importance des cellules ROR γ t ⁺ dans l'immunité innée.....	35
8.1. Homéostasie intestinale : un subtil équilibre	36
8.2. Impact du régime alimentaire dans la tolérance intestinale	37
8.3. Les cellules de l'immunité de type 17 orchestrent la réponse immunitaire	37
8.4. Défense de l'hôte contre les pathogènes extracellulaires.....	38
9. Rôle dans l'immunité adaptative	41
9.1. Les IgA.....	41
9.2. Rôle des molécules du CMH de classe II dans les ILC3.....	42
9.3. Expression du gène <i>Aire</i>	43

9.4.	Sécrétion d'IL-2 dans l'intestin.....	43
10.	Pathologies associées aux cellules de l'immunité de type 17.....	44
10.1.	Les MICI.....	44
10.2.	Le psoriasis.....	46
10.3.	La spondylarthrite ankylosante.....	47
B.	Les cellules dendritiques : premier acteur dans la réponse immune adaptative.....	48
1.	Initiation de la réponse immunitaire adaptative.....	48
2.	Découverte des cellules dendritiques.....	50
3.	Ontogénie des cellules dendritiques.....	51
3.1.	Généralités de la différenciation.....	51
3.2.	Différenciation des cellules dendritiques.....	51
3.3.	Les cytokines clés dans la différenciation des cellules dendritiques.....	53
3.4.	Voies transcriptionnelles de la différenciation des cellules dendritiques.....	54
4.	Les sous-populations de cellules dendritiques.....	56
4.1.	Les cellules dendritiques conventionnelles.....	56
4.2.	Cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	59
4.3.	Les cellules de Langerhans.....	60
4.4.	Cellules dendritiques inflammatoires.....	60
4.5.	Les cellules dendritiques dérivées <i>in vitro</i>	60
5.	Historique de la présentation antigénique.....	62
6.	Présentation des antigènes par la voie du CMH de classe I.....	64
6.1.	Généralités.....	64
6.2.	La molécule du CMH de classe I.....	65
6.3.	Dégradation des antigènes cytosoliques dans le protéasome.....	66
6.4.	Transport des peptides du cytosol au réticulum endoplasmique.....	67
6.5.	Liaison des peptides à la molécule du CMH de classe I.....	68

7.	Présentation des antigènes par la voie du CMH de classe II	69
7.1.	Biosynthèse des molécules du CMH de classe II.....	69
7.2.	Régulation de la molécule du MCH de classe II au cours de la maturation des cellules dendritiques	70
7.3.	Le compartiment d'apprêtement des antigènes : MIIC.....	71
7.4.	Liaison de molécule de CMH de classe II à la chaîne invariante	73
7.5.	Internalisation et dégradation des antigènes	74
7.6.	Chargement du peptide sur la molécule du CMH de classe II	76
7.7.	Transfert du complexe CMH II-peptide à la membrane plasmique.....	78
7.8.	Régulation de la voie du CMH de classe II par ubiquitination	78
8.	Mécanisme de cross-présentation aux lymphocytes T CD8 ⁺	79
8.1.	Généralités	79
8.2.	La voie cytosolique de cross-présentation.....	80
8.3.	La voie vacuolaire de cross-présentation.....	81
8.4.	Origine des molécules du CMH I pour la cross-présentation	82
9.	Recrutement des cellules dendritiques sur le site de l'inflammation	83
10.	Activation des cellules dendritiques	83
11.	Migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes.....	85
12.	Activation des lymphocytes T	86
13.	Le rôle tolérogénique des cellules dendritiques.....	88
14.	Les canaux ioniques dans les cellules dendritiques.....	89
C.	Etude de deux canaux ioniques dans le système immunitaire : TMEM176A et TMEM176B	91
1.	Identification de <i>Tmem176b</i> dans un modèle d'allogreffe chez le rat.....	91
2.	<i>Tmem176a</i> , le gène homologue de <i>Tmem176b</i>	92
3.	Expression tissulaire et cellulaire de <i>Tmem176a</i> et <i>b</i>	94

3.1.	Expression basale dans différents organes et types cellulaires.....	94
3.2.	Expression dans le système immunitaire.....	95
3.3.	<i>Tmem176a</i> et <i>b</i> sont fortement exprimés dans les cellules dendritiques	96
3.4.	Identification récente de l'expression des homologues dans les cellules ROR γ ⁺ 98	
4.	L'expression de <i>Tmem176a</i> et <i>b</i> est associée à différentes pathologies	100
4.1.	Les pathologies liées au système immunitaire	100
4.2.	Les cancers	101
5.	TMEM176B est un canal ionique impliqué dans des cellules dendritiques tolérogènes dérivées <i>in vitro</i>	102
6.	Etude du rôle de <i>Tmem176b</i> dans les cellules ROR γ ⁺	103
7.	Rôle de <i>Tmem176b</i> dans l'inflammasome	105
8.	Localisation intracellulaire de TMEM176A et B.....	106
9.	Génération d'une souris déficiente pour <i>Tmem176a</i> et <i>Tmem176b</i>	107
D.	Quel est le rôle de <i>Tmem176a</i> et <i>b</i> dans les cellules ROR γ ⁺ et les dans cellules dendritiques ?	111
	Résultats	114
A.	Etude du rôle de <i>Tmem176a</i> et <i>b</i> dans les cellules ROR γ ⁺ : résultats préliminaires	115
B.	Article : Dendritic cells require TMEM176A/B ion channel for optimal MHC II antigen presentation to naive CD4 ⁺ T cells	117
	Discussion	171
	Bibliographie	187

Table des illustrations

Figure 1 Représentation du locus Rorc localisé sur le chromosome 3 chez la souris.....	23
Figure 2 Le facteur de transcription ROR γ t est impliqué dans trois processus immunitaires majeurs.....	26
Figure 3 Développement, inter-régulation et spécificité cytokinique des lignées lymphocytaires Th1, Th2 et Th17.....	28
Figure 4 Les ILC sont le pendant inné des cellules Th: elles sécrètent des cytokines en commun et sont impliquées dans des réponses immunitaires.	31
Figure 5 Représentation des sous-populations cellulaires de la famille ROR γ t.....	35
Figure 6 Les DCs captent les antigènes et les dégradent en peptides pour les présenter aux lymphocytes T CD4+ T CD8+ naifs.....	48
Figure 7 Le développement des DCs chez la souris	53
Figure 8 Représentation simplifiée des différentes sous-populations de DCs	61
Figure 9 Représentation schématique de la présentation des antigènes endogènes par la voie du CMH de classe I.	69
Figure 10 Représentation schématique de la présentation des antigènes exogènes par la voie du CMH de classe II.	77
Figure 11 Représentation schématique de la cross-présentation des antigènes exogènes par la voie du CMH de classe I.....	82
Figure 12 Représentation schématique de la répartition des DCs et des lymphocytes dans la rate.	86
Figure 13 Représentation de l'interaction entre une DC et un lymphocyte T.....	88
Figure 14 Surexpression de Tmem176b dans les allogreffes cardiaques non rejetées chez les rats receveurs traités par TSD en comparaison des contrôles en rejet aigu5).....	91
Figure 15 Les homologues Tmem176a et Tmem176b sont situés sur le même locus chromosomique en direction opposée	93
Figure 16 Les protéines TMEM176A et TMEM176B sont des protéines intracellulaires de structure homologue.....	94

Figure 17 Représentation schématique de l'expression de Tmem176a et b dans les cellules du système immunitaire	96
Figure 18 Expression de Tmem176a et b dans les cellules du système immunitaire. L'expression issue des bases de données Immunonavigator (microarray data) et Immgen (RNAseq).....	98
Figure 19 TMEM176B est un canal ionique intracellulaire impliqué dans la régulation du pH phagosomal dans les DCs tolérogènes dérivées in vitro (ATDC)	103
Figure 20 Expression préférentielle de Tmem176a et b dans les cellules de la famille RORyt en comparaison aux autres différenciations.....	105
Figure 21 Génération des souris Tmem176a/b double KO (DKO) totale.....	109
Figure 22 Génération des souris Tmem176a/b DKO conditionnelles.....	110
Figure 23 Organisation du projet de thèse autour de trois grands axes.	113
Figure 24 Exacerbation de la colite induite au DSS chez les animaux DKO générées dans un fons génétique mélangé.....	116
Figure 25 Rôle de TMEM176A et B dans le compartiment CIITA pour la régulation du pH... .	181
Figure 26 TMEM176A/B pourraient interagir avec les molécules de la voie du CMH de classe II telle que HLA-DM indépendamment de leur fonction de canal ionique.....	183

Abréviations

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Aire	AutoImmune REgulator
APC	Antigen-Presenting Cell
AP1	Activator Protein 1
ARF7	ADP-Ribosylation Factor 7
ARF7EP	ARF7 Effector Protein
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
BATF	Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cell
BLS	Bare Lymphocyte Syndrome
CIITA	Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator
CDC42	Cell Division Cycle 42
CDP	Dendritic Cell Progenitor
Cellules ES	Cellule Souche Embyonnaire
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHILP	Common Helper Innate Lymphoid Progenitor
CILP	Common Innate Lymphoid Progenitor
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CLIP	Class-II-associated Invariant Chain Peptide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP	Common Myeloid Progenitor
cMOP	common MOnocyte Progenitor
CRAC	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DC	Dendritic Cell
DKO	Double KnockOut
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DRiPs	Defective Ribosomal Products
DSS	Dextran Sulfate Sodium
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
ERAP	Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FLT3l	Fms-Like Tyrosine kinase 3 Ligand
FOXP3	Forkhead bOX P3
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HCA112	Hepatocellular Carcinoma-associated Antigen 112
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IECs	Intestinal Epithelial Cells
IFNG	Interferon gamma
IgA	Immunoglobulin A
IL-6	Interleukin 6
ILC	Innate Lymphoid Cell
ILCP	Innate Lymphoid Cell Progenitor
ILFs	Isolated Lymphoid Follicles
ILVs	Intraluminal Vesicles
iNKT	invariant Natural Killer T
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP3	1,4,5-Inositol triphosphate
IRAK	IL1 Receptor Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
KO	KnockOut
LT	Lymphotoxin
LTi	Lymphoid Tissue-inducer cell
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MDP	Monocyte Dendritic cell Progenitor
MIP-3 α	Macrophage Inflammatory Protein 3 α
MMPs	Matrix Metalloproteinases
MPP	Multipotent Progenitor
MS4A	Membrane-Spanning 4-domains subfamily A
mTEC	medullary Thymic Epithelial Cell
MVB	Multiple Vesicular Bodies
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
NFIL3	Nuclear Factor Interleukin 3 regulated
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NK	Natural Killer
NOD-like	Nucleotide Oligomerization Domain - like
NOX2	NADPH Oxidase 2
NRPL3	NOD-like Receptor family Pyrin domain containing 3
ORP1L	cholesterol sensor OSBP-Related Protein 1L
PAMs	Peptide Anti-Microbiens
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PLC	Peptide Loading Complex

PLCy	PhosphoLipase Cy
PLZF	Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RAC	Rac family small GTPase
REG	Regenerating islet-derived protein
RILP	RAB7 Interacting Lysosomal Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
ROR γ t	Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ T
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SOCE	Store-Operated Ca ²⁺ Entry
SP	Signal Peptidase
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAP	Transporteur Associated with antigen Presentation
T-bet	T-Box trancription factor
TBK-1	TANK-Binding Kinase 1
Tfh	lymphocyte T Follicular Helper
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGN	Trans-Golgi Network
Th	lymphocyte T Helper
TIR	Toll-Interleukin 1 Receptor
TIRAP	Toll-Interleukin 1 Receptor domain containing Adaptor Protein
TLR	Toll-Like Receptor
TMEM176A/B	Transmembrane protein 176 A/B
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TORID	TOLerance Related and InduceD
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRANCE	TNF-Related ActivatioN-induced cytokine
TRIF	TIR-domain-containing adapter-Inducing interFeron- β
Treg	lymphocyte T Régulateur
TRPML2	Transient Receptor Potential channel MucoLipin 2
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid-1
TSD	Transfert de Sang du Donneur
UNC93B1	UNCoordinated 93 homolog B1
UPS	Ultra-pH-Sensitive
VAPA	VAMP-Associated Protein A
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Avant-propos

En 2015, j'ai rejoint l'équipe de Cédric Louvet et de Cristina Cuturi au sein de l'INSERM 1064 à Nantes, durant un stage de huit semaines en master 1. J'ai poursuivi l'année suivante par mon stage de master 2 puis par cette thèse. J'ai travaillé sur un projet d'immunologie fondamentale au travers de l'étude de gènes homologues dont la fonction est inconnue dans le système immunitaire. Ces gènes sont nommés *Tmem176a* et *b*.

Tmem176b a été initialement identifié dans le système immunitaire, par Cédric Louvet, comme préférentiellement surexprimé dans les cellules myéloïdes présentes au sein d'allogreffes non rejetées dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat (Louvet *et al.*, 2005). Plus récemment et de manière surprenante, une forte expression des deux gènes a été mise en évidence dans les cellules de la famille de ROR γ ⁺ telles que les ILC3 et les Th17. Cette dualité d'expression m'a intriguée et m'a poussée à investiguer le rôle de *Tmem176a* et *b*, à la fois dans les cellules ROR γ ⁺ et dans les cellules dendritiques au cours de cette thèse.

J'ai eu l'opportunité de débiter ma thèse au moment de la génération de souris doubles déficientes pour les gènes homologues. Dans un premier temps, j'ai étudié le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺. En parallèle, l'étude de la localisation intracellulaire des protéines nous a conduits à étudier leur rôle dans les cellules dendritiques et en particulier dans leur capacité à présenter les antigènes et à activer les lymphocytes T.

Cette introduction s'articulera en trois parties : la description des cellules ROR γ ⁺ et de l'immunité de type 17, le rôle des cellules dendritiques et les mécanismes de présentation antigénique et pour finir la description des connaissances actuelles sur les gènes *Tmem176a* et *b*. Les résultats que j'ai obtenus seront décrits dans un article en cours de soumission.

Introduction

A. L'immunité de type 17

1. La réponse immunitaire adaptative : les lymphocytes T

Le principal rôle du système immunitaire est d'assurer la défense de l'organisme contre les agents infectieux. Lorsque les barrières naturelles de l'organisme sont rompues, par exemple la peau ou les muqueuses, rapidement la réponse innée est mise en place. Cette réponse est majoritairement conduite par les neutrophiles et les macrophages qui ont une forte capacité de phagocytose et donc de clairance des pathogènes. A cette première réponse s'ajoute dans un deuxième temps la réponse adaptative. Celle-ci se compose d'une réponse humorale (lymphocytes B) et d'une réponse cellulaire (lymphocytes T) spécifique d'antigènes (du pathogène à éliminer par exemple).

Les lymphocytes T se répartissent en deux grandes sous-populations : les CD8⁺ et les CD4⁺. Ces deux types cellulaires ont des rôles distincts dans la réponse adaptative.

Les cellules CD8⁺ s'activent et deviennent des lymphocytes T cytotoxiques (CTL, cytotoxic T lymphocytes) capables de tuer les cellules cibles, Ces cellules sont reconnues par le récepteur des cellules T, TCR (T cell receptor). La reconnaissance de ce complexe permet la liaison de la cellule T à la cellule cible. Les CTL contiennent dans leur cytoplasme des granules cytotoxiques qu'ils vont relarguer vers la cellule cible au cours de ce contact. Ces granules contiennent deux types de molécules : des perforines qui permettent de lyser la membrane de la cellule cible et des granzymes cytotoxiques qui vont induire la mort de la cellule par apoptose. La cellule en apoptose sera phagocytée et éliminée par les macrophages.

Les lymphocytes T CD4⁺ agissent de manière différente, ils ne vont pas directement induire la mort des cellules cibles mais vont aider la réponse adaptative en épaulant d'autres types cellulaires. Ces cellules stimulent l'activité microbicide des macrophages, elles recrutent les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles et elles orchestrent divers pans de la réponse immune adaptative grâce à la production de cytokines et de chimiokines. Après leur activation, les cellules T CD4⁺ ont la capacité de pouvoir se différencier en plusieurs sous-populations selon l'environnement et la présence de signaux cytokiniques. Ces différentes sous-populations ont été nommées Th pour « T Helper ».

2. Le paradigme Th1/Th2

A l'origine, les lymphocytes T CD4⁺ étaient décrits comme une population homogène. Néanmoins en 1978, l'équipe de Takeshi Tokuhiwa a avancé l'hypothèse que les T CD4⁺ pourraient être répartis en deux sous-populations. Ces deux sous-populations ont été identifiées et séparées en utilisant une colonne en laine de nylon. La première population non adhérente a été nommée Th1 et les cellules adhérentes Th2 (Tada *et al.*, 1978). De plus, les auteurs ont montré que les deux populations lymphocytaires Th1 et Th2 fournissent une aide à la production d'anticorps par les lymphocytes B mais agissent via des mécanismes différents.

Par la suite, au milieu des années 80, les travaux des équipes de Tim Mosman et de Bob Coffman ont permis de confirmer qu'il était possible de distinguer deux sous-populations particulières de lymphocytes T CD4⁺ (Mosmann *et al.*, 1986). Il a été montré qu'une population est capable de sécréter l'IL-2 et l'IFN γ : les Th1. A l'inverse, l'autre population produit une autre cytokine nommée BSF1 (IL-4 actuellement) : les Th2. A partir de ces observations, il a été admis que les lymphocytes T CD4⁺ étaient capables de se différencier en Th1 et Th2 selon des signaux cytokiniques différents. Les Th1 sont induites par l'IL-12 et les Th2 par l'IL-4.

D'autres travaux ont, par la suite, permis de caractériser ces deux sous-populations. La différenciation des Th1 est favorisée par l'IFN γ et l'IL-12. Ces cytokines induisent le facteur de transcription T-bet (Tbox transcription factor) qui va ensuite activer les gènes spécifiques des Th1. Ces cellules produisent de l'IFN γ et de l'IL-2 (**Figure 3 – p20**). L'IFN γ sécrété par ces cellules va permettre l'activation d'autres cellules de l'immunité innée comme les Natural Killer (NK) et les macrophages, qui à leur tour vont produire des médiateurs solubles permettant l'élimination du pathogène. L'IFN γ a un effet antiviral en activant les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et augmente l'expression du CMH de classe I et du CMH de classe II à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (APCs, antigen-presenting cells) (Boehm *et al.*, 1997). L'IL-2 a un rôle associé en stimulant la prolifération des lymphocytes T et B et en inhibant la prolifération des Th2. La réponse Th1 joue un rôle dans la réponse immunitaire en cas de dommages tissulaires et de pathogènes intracellulaires (virus, bactéries).

Les Th2 produisent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13. Le facteur de transcription important pour les Th2 est GATA3 (**Figure 3 – p20**). L'IL-4 stimule leur propre prolifération et augmente la sécrétion des IgE (induction de la libération d'histamines par les mastocytes) (Le gros *et al.*, 1990) (Swain, Weinberg et Huston, 1990), l'IL-5 joue un rôle dans le recrutement des éosinophiles (Coffman *et al.*, 1989), l'IL-9 et l'IL-13 interviennent dans la production de mucus par les cellules épithéliales et l'élimination des helminthes (Longphre *et al.*, 1999) (Urban *et al.*, 1998). Par conséquent, les cellules Th2 jouent un rôle dans les allergies et dans la réponse contre les parasites extracellulaires.

La mise en évidence de ces sous-populations s'accompagne également du concept qu'elles s'inhibent mutuellement (Mosmann *et al.*, 1986). Par exemple, la réponse Th1 peut être inhibée par l'IL-4 ou l'IL-10, deux cytokines sécrétées par les Th2 (Taga et Tosato, 1992) (Koch *et al.*, 1996). A l'inverse, l'IFN γ inhibe directement l'expression du gène de l'IL-4 et empêche ainsi la différenciation des Th2 (Elser *et al.*, 2002).

3. Identification de l'IL-23 et des cellules Th17

La mise en évidence des sous-populations Th1 et Th2 a eu un profond impact sur la façon de percevoir et de comprendre la réponse immunitaire adaptative. Néanmoins, ces deux populations ne permettaient pas à elles seules d'expliquer un certain nombre de modèles autoimmuns chez l'animal ainsi que des études chez l'homme. En particulier pour le modèle d'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) chez les rongeurs, dans lequel les Th1 étaient considérés comme l'inducteur principal de la pathologie. Cependant, les résultats décrivant l'impact des Th1 étaient contradictoires. En effet, la principale cytokine sécrétée par les Th1 est l'IFN γ . Lorsque des rats sont traités par administration d'IFN γ , il a été montré une réduction de la pathologie, suggérant paradoxalement un effet protecteur des Th1 (Voorthuis *et al.*, 2008). Cependant, des animaux déficients pour le facteur de transcription T-bet, nécessaire à la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1, sont résistants à l'EAE, les Th1 sont donc clairement requis pour le développement de la pathologie (Bettelli *et al.*, 2004).

Au début des années 2000, la mise en évidence d'une nouvelle cytokine nommée IL-23 a fait la lumière sur ces éléments contradictoires. La cytokine IL-12 est un hétérodimère composé de deux sous-unités, la p40 et la p35. Il a été mis en évidence que la sous-unité p40 peut se lier une autre sous-unité, nommée p19. L'association de l'hétérodimère p40-p19 forme l'IL-

23 (Oppmann *et al.*, 2000). Cette cytokine est produite par les cellules myéloïdes, principalement les cellules dendritiques (DCs, dendritic cells) et les macrophages. En 2003, les travaux de Daniel Cua ont mis en évidence l'implication de l'IL-23 dans le modèle d'EAE en utilisant des souris déficientes pour une des trois sous-unités p40, p19 et p35 (Cua *et al.*, 2003). Seuls, les animaux déficients pour la sous-unité p19 ou p40 étaient protégés de l'EAE. Autrement dit, il a été établi que l'IL-23 est une cytokine cruciale pour le développement de la pathologie contrairement à l'IL-12. Ensuite, l'équipe de Cua a mis en évidence que l'IL-23 induit l'expansion d'une population T CD4⁺ caractérisée par la production d'IL-17A, IL-17F, IL-6 et de TNF (Langrish *et al.*, 2005). Dans cette étude, il a été montré que le transfert adoptif des cellules T CD4⁺ produisant l'IL-17 induit l'EAE chez la souris. A l'inverse les T CD4⁺ produisant seulement l'IFN γ sont incapables d'induire la pathologie. L'ensemble de ces arguments a permis de soutenir l'identification de cette nouvelle différenciation de cellules Th, nommée Th17.

4. Le facteur de transcription ROR γ t

Plusieurs études ont conduit à l'identification du facteur de transcription ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t). Une première étude s'est intéressée à l'identification de nouveaux récepteurs nucléaires d'hormones spécifiques de tissus (Eberl, 2017). Il a été mis en évidence deux nouveaux récepteurs rétinoïdes nommés RZR α et RZR β exprimés dans les cellules endothéliales ombilicales (Becker *et al.*, 1993) et le cerveau de rat (Carlberg *et al.*, 1994). Il a été montré que ce sont deux récepteurs à la mélatonine et qu'ils font partie de la famille des gènes du rythme circadien. Ensuite, en utilisant l'ADNc du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) α , il a été mis en évidence, dans le cerveau de rat, un récepteur nucléaire orphelin nommé ROR α et identique à RZR α . Puis, le troisième membre de la famille RZR/ROR a été identifié à partir d'une librairie du pancréas humain et nommé ROR γ . C'est à la fin des années 1990 que ROR γ t a été découvert. Il s'agit d'un isoforme plus court de ROR γ mis en évidence lors de l'étude des protéines capables de conférer une résistance à l'apoptose médiée par le TCR dans le thymus (He *et al.*, 1998). Son nom ROR γ t vient de son identification dans le thymus. Elle correspond à la séquence de ROR γ de l'exon 3 à l'exon 11 et a les mêmes domaines de liaison à l'ADN (DBD DNA-binding domain) et au ligand (LBD ligand-binding domain) (**Figure 1**). ROR γ t et ROR γ diffèrent par les cent premiers

nucléotides qui correspondent au domaine N-terminal de la protéine, qui est donc absent chez ROR γ t.

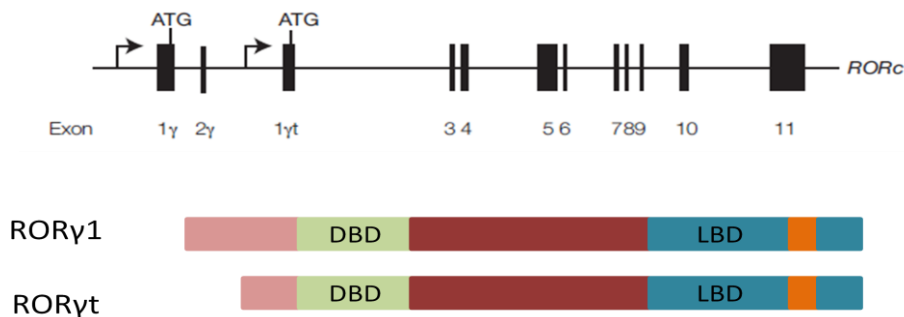


Figure 1 Représentation du locus *Rorc* localisé sur le chromosome 3 chez la souris. Représentation schématique des domaines structuraux des protéines ROR γ et ROR γ t (figure réalisée selon Rutz et al., *Cytokine Growth F R.* 2016).

L'équipe de Michael Bevan a mis en évidence que ROR γ t est indispensable à la survie des thymocytes CD4⁺CD8⁺ (He *et al.*, 1998). Puis, l'équipe de Dan Littman a montré que ROR γ contrôle la régulation de Bcl-xL qui est un gène anti-apoptotique (Sun *et al.*, 2000) (**Figure 2**). L'expression de Bcl-xL dans les thymocytes double positifs leur confère l'opportunité d'interagir avec les complexes CMH/peptide pour la sélection positive. De manière très intéressante, ces travaux ont également mis en évidence que le rôle de ce facteur de transcription n'est pas restreint au thymus. En effet, les souris déficientes pour ROR γ n'ont ni ganglions, ni plaques de Peyer ; par contre, le développement de la rate n'est pas altéré (Sun *et al.*, 2000). Le transfert de cellules souches hématopoïétiques de ces souris dans des souris RAG KO (knock-out) permettant un développement normal des organes lymphoïdes secondaires, les auteurs ont pu exclure un défaut intrinsèque aux cellules B et T. Leurs travaux ont également mis en évidence que les cellules progénitrices associées aux ganglions mésentériques du fœtus expriment fortement le gène ROR γ et qu'elles sont absentes des fœtus déficients. A la suite de ces résultats, cette équipe s'est intéressée au rôle spécifique de ROR γ t dans les cellules LTi (lymphoid tissue inducer) qui sont les premières cellules hématopoïétiques localisées dans les ganglions et les plaques de Peyer à l'état embryonnaire (Eberl *et al.*, 2004). Une souris déficiente a été générée spécifiquement pour ROR γ t mais pas pour ROR γ . Cette souris a été générée en insérant une molécule GFP, ce qui a permis d'observer la localisation des cellules ROR γ t-GFP chez les animaux hétérozygotes. L'étude des fœtus hétérozygotes a montré que ROR γ t est exprimé dans les cellules qui correspondent en terme de localisation et de phénotype aux cellules LTi (CD3⁻CD4⁺ et CD3⁻IL-

7R α^+). Le facteur de transcription est donc nécessaire à la génération des cellules LTi, elles-mêmes indispensables au développement des ganglions et des plaques de Peyer (**Figure 2**). Il a été mis en évidence que le développement des organes lymphoïdes secondaires nécessite la lymphotoxine LT $\alpha_1\beta_2$ produite par les cellules ROR γ^+ . En effet, de manière similaire aux souris déficientes pour ROR γ , l'absence de la lymphotoxine LT $\alpha_1\beta_2$ inhibe le développement des ganglions chez la souris (De Togni *et al.*, 1994). Cependant, cette cytokine n'est pas suffisante pour rétablir le développement des ganglions chez les animaux déficients pour ROR γ (Eberl *et al.*, 2004). D'autres facteurs sont impliqués, notamment la cytokine TRANCE (TNF-Related Activation Induced Cytokine). Les souris déficientes pour TRANCE présentent également une altération du développement des ganglions (Kim *et al.*, 2000). Au cours de l'embryogénèse, les précurseurs migrent dans des sacs lymphatiques puis s'y différencient en cellules LTi. La cytokine TRANCE permet l'accumulation des cellules LTi dans ces sacs lymphatiques. Ensuite, les LTi expriment la lymphotoxine LT $\alpha_1\beta_2$ qui agit sur les cellules mésenchymateuses. En réponse, ces cellules s'organisent en cluster. Puis d'autres processus permettront la formation d'organes lymphoïdes secondaires matures (Blum et Pabst, 2006). Ainsi, les cellules LTi ROR γ^+ produisent différents facteurs nécessaires au développement des organes lymphoïdes secondaires.

5. ROR γ est le facteur de transcription induisant les Th17

Il faudra attendre une dizaine d'années avant que l'équipe de Dan Littman mette en évidence que le facteur de transcription ROR γ est associé à la différenciation des cellules Th17. Ce rapprochement a représenté une étape cruciale pour la compréhension de cette différenciation puisque ROR γ , dans les Th17, rejoignait les autres régulateurs « maîtres » T-bet, GATA-3 et FOXP3, pour le développement des Th1, Th2 et Tregs, respectivement.

Suite à la mise en évidence du rôle de ROR γ dans le développement des ganglions, cette équipe s'est intéressée au rôle de ce facteur de transcription dans le développement des cellules T et dans l'organogénèse lymphoïde (Ivanov *et al.*, 2006). Pour cela, la souris précédemment décrite et exprimant la GFP à la place de ROR γ a été utilisée et l'expression de ROR γ dans le thymus a été confirmée. De manière intéressante et contrairement à l'article de 2004, il a été mis en évidence une expression de ROR γ en périphérie, dans la lamina propria de l'intestin. Il a été montré que les cellules ROR $\gamma^{\text{GFP}/+}$ de l'intestin expriment un TCR, ce sont donc des lymphocytes T. En parallèle, afin de comprendre les mécanismes

de différenciation des Th17, l'analyse transcriptionnelle de ces cellules a été réalisée. Il a été mis en évidence qu'elles expriment fortement le facteur de transcription ROR γ t en comparaison aux Th1. En effet, dans la lamina propria de souris contrôles, environ 10% des lymphocytes CD4⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ (précédemment mis en évidence produisent) l'IL-17. Par contre, chez la souris déficiente pour ROR γ t (ROR γ t^{gfp/gfp}), le nombre de ces cellules est divisé par dix et représente seulement 1% des CD4⁺. Ensuite, il a été montré que la transduction de ROR γ t dans des cellules T CD4⁺ purifiées est suffisante pour induire l'expression de l'IL-17A et l'IL-17F (Ivanov *et al.*, 2006). Ainsi, en absence de ROR γ t, le développement des Th17 est fortement inhibé et son expression est suffisante pour induire la production d'IL-17A et d'IL-17F. ROR γ t est donc le facteur de transcription des Th17 (**figure 2**).

Pour étayer ces résultats, Dan Littman et son équipe ont utilisé le modèle d'EAE. Il a été montré que les souris déficientes pour ROR γ t développent moins la pathologie que les souris contrôles. Pour s'assurer que cette observation n'était pas due à l'absence des ganglions périphériques, des chimères de moelle osseuse ont été réalisées dans des souris RAG2^{-/-}. Ces souris n'ont en effet pas d'atteintes des organes lymphoïdes secondaires et sont déficientes pour ROR γ t dans les cellules hématopoïétiques. Il a été mis en évidence une diminution de l'incidence de la pathologie (Ivanov *et al.*, 2006). Autrement dit, les cellules ROR γ t⁺ sont impliquées dans le développement de l'EAE.

Ainsi, Dan Littman et son équipe ont mis en évidence que ROR γ t est le facteur de transcription clé impliqué dans la différenciation des Th17. Il induit la transcription des gènes codant pour l'IL-17A et l'IL-17F en réponse à une stimulation par l'IL-6 et le TGF- β .

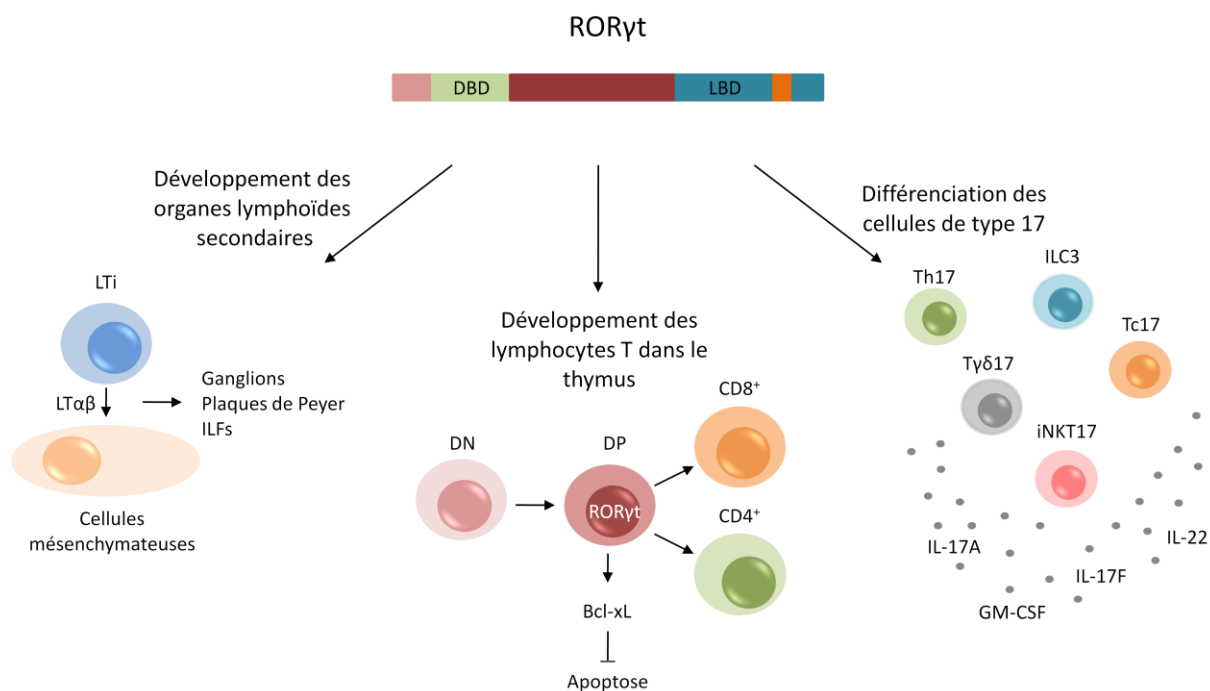


Figure 2 Le facteur de transcription RORγt est impliqué dans trois processus immunitaires majeurs, via des cellules différentes: le développement des organes lymphoïdes secondaires, la survie des cellules DP dans le thymus au cours de la sélection des lymphocytes T et l'induction de la différenciation des cellules de type 17 (figure réalisée selon Rutz et al., *Cytokine Growth F.R.* 2016).

6. Différenciation des Th17 *in vivo* et *in vitro*

Les lymphocytes T CD4⁺ ont besoin du signal induit par le facteur de transcription RORγt pour se différencier en Th17. Comme nous venons de le voir, l'équipe de Dan Littman a mis en évidence que la surexpression de RORγt dans des cellules CD4⁺ était suffisante pour induire l'expression de l'IL-17A et l'IL-17F (Ivanov *et al.*, 2006). Néanmoins, pour permettre la différenciation en Th17, l'induction de l'expression de RORγt est dépendante de signaux cytokiniques.

Lorsque les Th17 ont été mises en évidence, il était admis que l'IL-23 permettait de les différencier (Aggarwal *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005). Par la suite, plusieurs études ont permis de mieux comprendre quels facteurs induisent leur différenciation.

L'équipe de Dan Littman a montré que les souris déficientes pour l'IL-6 présentent une diminution d'un facteur dix du nombre de cellules produisant l'IL-17 dans la lamina propria (Ivanov *et al.*, 2006). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec des animaux déficients pour RORγt (Ivanov *et al.*, 2006). De plus, les cellules T CD4⁺ des animaux déficients pour l'IL-6 n'expriment pas RORγt, l'IL-17F ni la chaîne spécifique du récepteur à l'IL-23. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que la cytokine IL-6 induit la surexpression de RORγt et du

récepteur à l'IL-23, ce qui permet la différenciation des Th17 dans la lamina propria de l'intestin. De manière intéressante, le TGF β est également nécessaire à la différenciation des Th17 (Veldhoen *et al.*, 2006). Plusieurs équipes ont étudié le rôle du TGF β dans la différenciation des Th17 et, bien que sa fonction ait été très controversée, il est admis que le TGF β induit les Th17. Le TGF β en forte quantité induit la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules T régulatrices (Treg). Par contre, lorsque cette cytokine est en plus faible quantité et associée à l'IL-6, les cellules T se différencient en Th17. L'équipe de Gérard Eberl a montré qu'il y a dans l'intestin un équilibre entre les Th17 inflammatoires induisant une réponse contre les pathogènes extracellulaires et les Treg qui modulent la réponse immunitaire avant qu'elle ne devienne pathologique (Lochner *et al.*, 2008). Ainsi l'IL-6 et le TGF β induisent l'expression de ROR γ t, qui lui-même induit l'expression de l'IL-17A et F (Ivanov *et al.*, 2006).

D'autres combinaisons cytokiniques ont été mises en évidence dans la différenciation des Th17. Les travaux de Caroline Sutton ont montré que l'IL-1 et l'IL-23 peuvent ensemble médier la production d'IL-17 par des cellules CD4⁺ purifiées (Sutton *et al.*, 2006). De plus, il a été mis en évidence que les animaux déficients pour le récepteur à l'IL-1 (IL-1RI^{-/-}) sont résistants au modèle d'EAE, comme c'est le cas pour les animaux déficients pour l'IL-17. En 2007, il a été mis en évidence que l'IL-21 pouvait également induire la différenciation des Th17 avec le TGF β . En effet, ces deux cytokines ensemble, sont capables d'inhiber la voie de différenciation des Treg et d'induire la sécrétion d'IL-17 et l'expression de ROR γ t (Korn *et al.*, 2007). Ainsi, la différenciation des Th17 est dépendante d'un équilibre entre plusieurs cytokines (**Figure 3**).

Chez l'homme, le cocktail cytokinique TGF- β , IL-1 β et IL-6, IL-21 ou IL-23 permet l'induction de l'IL-17 et l'expression de ROR γ t dans des cellules naïves CD4⁺ (Manel, Unutmaz et Littman, 2008). De manière similaire à la souris, le TGF β est une cytokine centrale dans la différenciation des Th17 humaines.

In vitro, il est possible de différencier des cellules murines CD4⁺ purifiées en Th17 en les stimulant avec, d'une part, des anticorps qui vont mimer les signaux 1 et 2 pour activer les cellules c'est-à-dire, un anti-CD3 et un anti-CD28 et, d'autre part, un cocktail cytokinique constitué d'IL-6 et de TGF β . De plus, l'ajout d'anticorps anti-IFN γ et anti-IL-4 inhibe les différenciations Th1 et Th2 et potentialise la différenciation Th17. De manière similaire aux

cellules murines, les cellules T CD4⁺ humaines sont activées avec un anti-CD3 et un anti-CD28 et le milieu est supplémenté en IL-6, TGFβ, IL-1β, et IL-23.

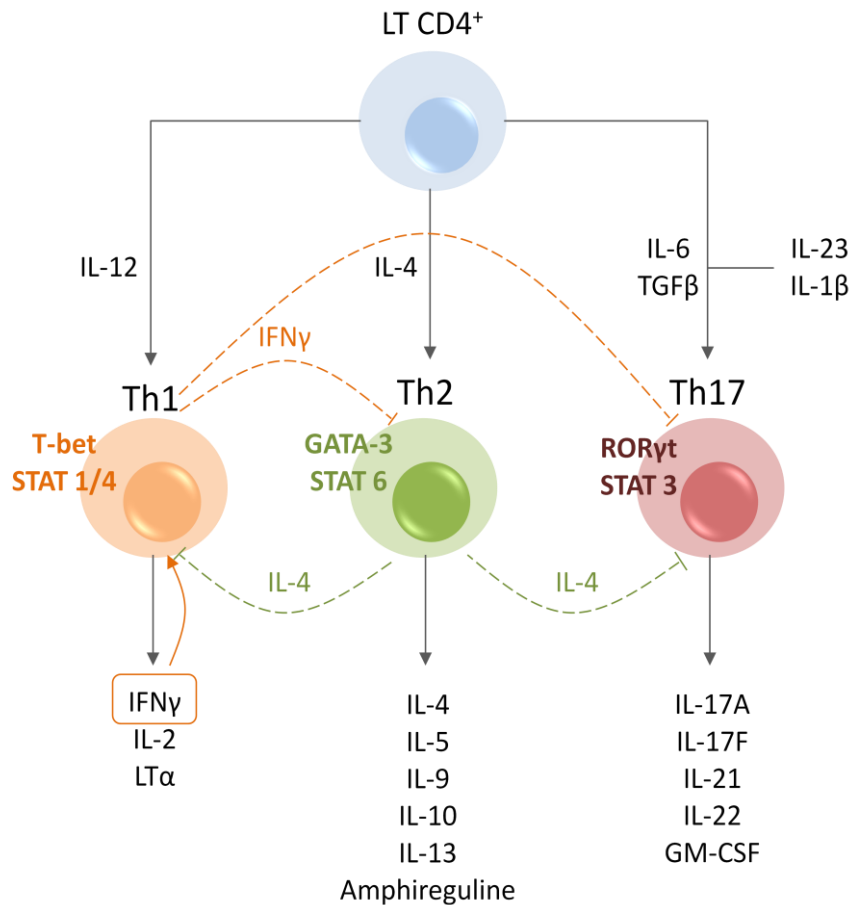


Figure 3 Développement, inter-régulation et spécificité cytokinique des lignées lymphocytaires Th1, Th2 et Th17.

Pour induire la différenciation des Th17, les cytokines présentes dans le milieu ont un rôle crucial. Pour aller plus loin dans la compréhension de cette différenciation, l'équipe de Dan Littman s'est intéressée à l'étude du réseau de régulation transcriptionnelle de ces cellules (Ciofani *et al.*, 2012). Il a ainsi été mis en évidence des facteurs de transcription et des gènes impliqués dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th17. Les facteurs de transcription BATF et IRF4 agissent de manière coopérative pour permettre l'accessibilité de la chromatine à STAT3 qui induit le programme de transcription dirigé par ROR γ t. De manière intéressante, il a été démontré que ROR γ t lie spécifiquement une liste restreinte de onze gènes, incluant l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-23r. Parmi ces onze gènes, certains n'ont pas de fonction connue associée aux Th17. Notamment deux gènes homologues nommés

Tmem176a et *b* (Ciofani *et al.*, 2012), qui sont au centre de mon projet de thèse et sur lesquels je reviendrai ultérieurement.

7. La famille de l'immunité de type 17

La famille de l'immunité de type 17 ne compte pas uniquement les Th17 mais aussi d'autres populations cellulaires toutes caractérisées par le facteur de transcription ROR γ t et par un profil cytokinique commun (IL-17 et IL-22).

7.1. Identification d'un nouveau type cellulaire : les ILC

Dans les années 2008 et 2009, les connaissances en immunologie ont été remaniées avec l'identification d'une population cellulaire innée jusqu'alors complètement inconnue. Plusieurs équipes ont simultanément mis en évidence l'existence d'une population cellulaire ressemblant aux cellules L_Ti tout en ayant des caractéristiques des cellules NK, par exemple NKp46⁺ chez la souris et NKp44⁺ chez l'homme, mais n'exprimant pas de TCR (Sato-Takayama *et al.*, 2008; Cella *et al.*, 2009; Luci *et al.*, 2009; Sanos *et al.*, 2009). En effet, l'équipe de James Di Santo a montré l'existence d'une population CD3⁻NKp46⁺ dans la lamina propria de l'intestin de souris (Sato-Takayama *et al.*, 2008). De manière intéressante, contrairement aux cellules NK de la rate qui sont très homogènes (NK1.1⁺CD127⁻), les auteurs ont montré une plus grande hétérogénéité dans les cellules de l'intestin en identifiant trois sous-populations. Les cellules NK1.1⁺CD127⁺ et NK1.1⁺CD127⁻ expriment également d'autres marqueurs spécifiques des cellules NK tels que NKG2D. Les cellules NK1.1⁻CD127⁺ expriment moins de marqueurs NK ou moins fortement. Cette nouvelle population a également été montrée par les équipes d'Elena Tomasello et Andreas Diefenbach chez la souris (Luci *et al.*, 2009; Sanos *et al.*, 2009) et de Marco Colonna chez l'homme (Cella *et al.*, 2009). Pour mieux comprendre cette population, sa fonction a été étudiée en s'intéressant dans un premier temps aux fonctions connues des cellules NK. Il a été mis en évidence que ces cellules n'exprimaient pas de perforines nécessaires à la fonction cytotoxique des NK et n'étaient pas capables de produire l'IFN γ (Sato-Takayama *et al.*, 2008). Autrement dit, ces cellules présentent des marqueurs des cellules NK mais n'ont pas une fonction associée à ces cellules. Pour comprendre leur fonction, des analyses d'expression de gènes ont été réalisées et confirmées en qPCR. Ces différentes équipes ont mis en évidence que ces cellules expriment le facteur de transcription ROR γ t et sécrètent

l'IL-22 (Sato-Takayama *et al.*, 2008). Ces résultats ont ainsi mené à l'identification d'une population cellulaire lymphocytaire innée alors appelée NK22 ou ROR γ t⁺NKp46⁺ selon les laboratoires et par la suite appelée ILC3.

De la même manière, en 2011, l'équipe d'Andrew McKenzie a mis en évidence une nouvelle population cellulaire innée nommée nuocyte et appartenant à l'immunité de type 2 (Neill *et al.*, 2010). Les cellules de l'immunité de type 2 sont importantes dans les réponses antiparasitaires notamment contre les helminthes, en sécrétant l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Les principales cellules produisant ces cytokines sont les Th2. Cette équipe s'est intéressée à mettre en évidence les acteurs innés de la réponse antiparasitaire. Pour cela, une souris *IL13eGFP* a été générée. L'administration d'IL-25 ou d'IL-33 entraîne une augmentation de cellules non T, IL-13GFP⁺, dans l'intestin et la rate de cette souris. Il a été montré que ces cellules sont la principale source d'IL-13 lors d'une infection à *Nippostrongylus brasiliensis*. A l'inverse, l'absence du signaling IL-25 ou IL-33, au cours de l'infection, inhibe l'expansion des nuocytes et entraîne un défaut de la réponse antiparasitaire. De plus, le transfert adoptif de nuocytes expansus *in vitro* dans ces souris permet de corriger ce défaut et de rétablir la réponse antiparasitaire (Neill *et al.*, 2010).

Ainsi, il a été mis en évidence plusieurs populations cellulaires innées dont les caractéristiques étaient similaires aux Th1, Th2 et Th17. Chaque laboratoire ayant identifié une de ces populations, l'a nommée différemment. En peu de temps, de nombreuses populations nommées de manière différente ont donc émergé. Rapidement, en recoupant leurs caractéristiques, ces populations ont été classées en trois catégories d'ILC pour « Innate Lymphoid Cells » : les ILC de type 1 (dont font partie les cellules NK), les ILC de type 2 et les ILC de type 3 (dont font partie les LTi) (Spits *et al.*, 2013). En 2018, cette nomenclature a été remise à jour en prenant en compte les nouvelles connaissances. En se basant sur leur voie de développement et leur fonction, il est maintenant proposé une classification en cinq groupes : les cellules NK, les ILC1, les ILC2, les ILC3 et les LTi (Vivier *et al.*, 2018) (**Figure 4**).

Ces cellules sont le miroir inné des sous-populations des lymphocytes T CD4⁺ : Th1, Th2 et Th17. Les différentes sous-populations d'ILC et de Th partagent des facteurs de transcription et des profils cytokiniques communs. Les ILC sont des cellules résidentes des tissus, ce sont les premiers acteurs de la réponse immunitaire en agissant rapidement en réponse aux cytokines ou aux signaux de danger produits dans leur environnement (**Figure 4**).

Une autre caractéristique importante des ILC est leur plasticité. En effet, sous l'influence de facteurs environnementaux, leur phénotype peut être modifié. Elles peuvent exprimer des marqueurs et des cytokines qui ne sont pas caractéristiques de leur groupe mais d'un autre groupe d'ILC. Il existe donc une plasticité développementale et fonctionnelle des différentes populations d'ILC (Crinier *et al.*, 2017). Par exemple, sous l'influence de l'IL-1 β et de l'IL-12, les ILC2 peuvent acquérir les marqueurs (expression de T-bet) et les fonctions (production d'IFN γ) des ILC1.

En ce qui concerne leur développement, les ILC sont générées à partir du CLP (progéniteur commun lymphoïde) dans la moelle osseuse. Ce progéniteur donne naissance aux progéniteurs des cellules T, B et au CILP, le progéniteur des cellules NK et des ILC. Ce progéniteur se différencie en CHILP, le progéniteur commun aux ILC et aux LTi puis en ILCP le progéniteur commun des ILC (PLZF⁺ ILC). L'expression de facteurs de transcription induit la différenciation des différents types de progéniteurs. Pour induire le développement des ILC, les facteurs de transcription Id2, Nfil3 et GATA3 sont nécessaires (Eberl *et al.*, 2015).

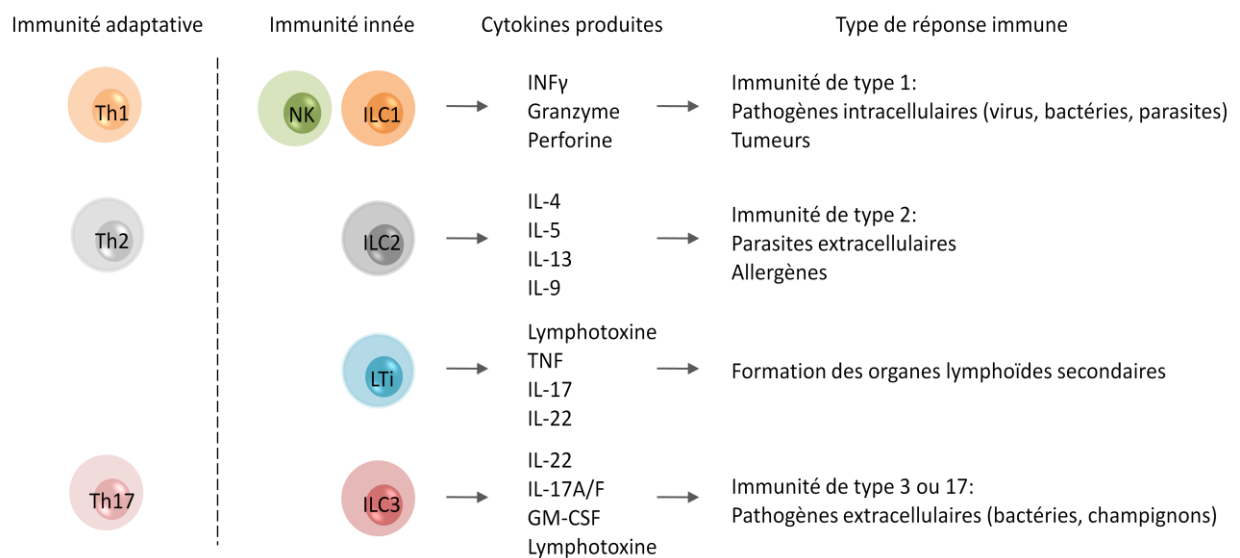


Figure 4 Les ILC sont le pendant inné des cellules Th. Selon leur différenciation, ces cellules ont en commun la sécrétion d'un panel de cytokines spécifique et sont impliquées dans des réponses immunitaires communes (figure réalisée selon Vivier *et al.*, *Cell*. 2018).

7.2. Les ILC3, l'équivalent inné des Th17

Les ILC3 regroupent deux grandes sous-populations, les ILC3 NKp44⁺ et les ILC3 NKp44⁻ chez l'homme ou ILC3 NCR⁺ et ILC3 NCR⁻ chez la souris (Crinier *et al.*, 2017; Vivier *et al.*, 2018). A

l'origine, les LTI (LTI-like ILC3) étaient incluses dans les ILC3, cependant la nouvelle nomenclature proposée en 2018 les classe dans un groupe à part.

Les ILC3 sont principalement localisées dans les muqueuses et jouent un rôle dans l'immunité contre les pathogènes extracellulaires. Ces cellules sont très importantes au niveau de l'intestin en permettant le confinement des pathogènes commensaux (Sato-Takayama *et al.*, 2008; Cella *et al.*, 2009). Les ILC3 sont activées par l'IL-23 et l'IL-1 β produites par les DCs et les macrophages, en réponse aux infections bactériennes ou fongiques (Klose et Artis, 2016). Suite à leur stimulation, elles produisent l'IL-17, l'IL-22, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulation factor) et les lymphotoxines LT α_3 et LT $\alpha_1\beta_2$ (Vivier *et al.*, 2018). Ces molécules permettent l'induction de la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales de l'intestin, la sécrétion de chémokines par les cellules stromales et épithéliales pour le recrutement d'éosinophiles et l'activation des lymphocytes B. Ainsi, les ILC3 agissent rapidement en réponse aux cytokines et aux divers signaux microbiens auxquels elles sont exposées.

Il existe une certaine plasticité chez ces cellules. Les ILC3 ont la capacité de diminuer l'expression de ROR γ t et d'augmenter celle de Tbet afin de produire de l'IFN γ lors d'une inflammation importante. Ces cellules sont alors nommées ex-ILC3 (Klose *et al.*, 2013).

De manière intéressante, les ILC3 NCR $^-$ chez la souris expriment le CMH de classe II ainsi que plusieurs composants de la voie de présentation des antigènes associée au CMH de classe II (Crinier *et al.*, 2017). Je reviendrai sur le rôle de ces cellules ultérieurement.

De manière similaire aux cellules Th17, des équipes se sont intéressées à définir précisément le programme transcriptionnel définissant les sous-populations des ILC. L'équipe de Marco Colonna a analysé l'expression génique des ILC1, ILC2 et ILC3 et de leurs sous-populations (Robinette *et al.*, 2015). Ils ont mis en évidence une signature génique des ILC comprenant dix-sept gènes. De manière intéressante, parmi ces gènes figurent *Tmem176a* et *Tmem176b*, qui sont plus particulièrement surexprimés dans les ILC3 en comparaison aux autres différenciations. Ainsi, ces deux gènes ont été associés aux Th17 et aux ILC3, deux acteurs de l'immunité de type 17.

7.3. Les cellules T $\gamma\delta$ 17

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ se situent à la frontière de l'immunité innée et adaptative car ils partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles à la fois des cellules NK et

des lymphocytes T $\alpha\beta$. Ils sont minoritaires parmi les autres types cellulaires mais jouent un rôle important dans les réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-tumorales. Les cellules T $\gamma\delta$ sont capables de répondre spécifiquement à un antigène, mais aussi de façon innée et rapide aux signaux du microenvironnement tels que des cytokines inflammatoires (Bonneville, O'Brien et Born, 2010). Il a été mis en évidence qu'une population de cellules T $\gamma\delta$ est capable de sécréter l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22, l'IL-21 en réponse à une stimulation par l'IL-23 et l'IL-1 β et sans engagement du TCR (Sutton *et al.*, 2009). Cette population a été nommée T $\gamma\delta$ 17 (**Figure 5**). Cette capacité à produire des cytokines sans activation du TCR permet aux cellules T $\gamma\delta$ de répondre rapidement à un stimulus. Il a été montré que suite à une infection microbienne, ces cellules sont capables de produire l'IL-17A dans les 4 à 8h après la détection de l'infection (Happel *et al.*, 2005).

Les T $\gamma\delta$ 17 ont également été associées à des pathologies et en particulier au psoriasis. Il s'agit d'une pathologie chronique caractérisée par une hyper-prolifération des kératinocytes. Chez la souris, il existe un modèle consistant en l'application de la crème Aldara™ qui induit une dermatite ectopique mimant le psoriasis chez l'homme. Chez la souris, il a été mis en évidence que les T $\gamma\delta$ de la peau expriment le récepteur à l'IL-23 et sécrètent l'IL-17 (Pantelyushin *et al.*, 2012) (Cai *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que l'inflammation et l'hyperplasie épidermique induite par l'IL-23 sont diminuées chez des souris déficientes pour la chaîne δ du TCR mais pas chez des souris déficientes pour la chaîne α (Cai *et al.*, 2011). Chez les patients atteints de psoriasis, il a été mis en évidence une augmentation du nombre de cellules T $\gamma\delta$ de la peau, 40% des cellules CD3⁺ contre 15% chez des volontaires sains (Cruz *et al.*, 2018).

7.4. Les cellules iNKT17

Les cellules iNKT (invariant natural killer T cells) expriment un TCR dont le répertoire est restreint. En effet, ce TCR est constitué d'une chaîne invariante α associée à une chaîne β dont la diversité est limitée. Ce TCR reconnaît seulement des antigènes de type glycolipide associés à la molécule du CMH de classe I non polymorphe nommée CD1d (Kawano *et al.*, 1997; Kronenberg *et al.*, 2005). Les cellules iNKT ont une forte capacité à sécréter des cytokines, notamment l'IL-4, l'IFN γ , le TNF α , l'IL-3 et le GM-CSF en réponse à la liaison de leur TCR avec une molécule CD1d liée à un glycolipide. Le plus connu pour activer les iNKT est l' α -Gal-Cer (Kronenberg *et al.*, 2005). Ces cellules ont été impliquées aussi bien dans des

réponses immunitaires que dans des voies pathologiques. En effet, elles participent à la réponse anti-tumorale mais sont également impliquées dans les allergies et les pathologies auto-immunes. Il a été mis en évidence que ces cellules induisent une forte protection contre le pathogène *Streptococcus pneumonia* en induisant le recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires. En se basant sur ces informations, l'équipe de Maria Leite-de-Moraes a mis en évidence une sous-population de iNKT n'exprimant pas le marqueur de surface NK1.1 et produisant l'IL-17 (Michel *et al.*, 2007) (**Figure 5**). Ensuite, il a été mis en évidence que ces cellules sont présentes dans le thymus et que ROR γ t est le facteur de transcription pour leur différenciation en cellules productrices d'IL-17 (Michel *et al.*, 2008). De manière similaire aux lymphocytes CD4⁺ Th et aux ILC, les cellules iNKT ont été divisées en trois principales sous-populations : les iNKT 1, les iNKT2 et les iNKT3. L'équipe de Mitchell Kronenberg s'est intéressée à analyser les différentes populations de iNKT du thymus chez la souris, en se basant sur les gènes qu'elles expriment et leur régulation épigénétique (Engel *et al.*, 2016). Les auteurs ont confirmé l'existence des trois sous-populations iNKT1, iNKT2 et iNKT3 par l'expression respective de T-bet, PLZF et ROR γ t. Autrement dit, malgré leur spécificité antigénique similaire, les cellules iNKT forment des populations distinctes avec des expressions géniques et des régulations épigénétiques très différentes (Engel *et al.*, 2016). Dans cette étude, les auteurs ont caractérisé les cellules iNKT3 et les gènes qu'elles expriment. Ainsi, les gènes *Il23r* et *Il1r* sont par exemple surexprimés. Ces résultats corrélerent avec les caractéristiques de l'immunité de type 17. De manière intéressante, d'autres gènes sont également surexprimés et notamment *Tmem176a* et *Tmem176b*, comme c'était le cas pour les Th17 et les ILC3.

7.5. Les cellules Tc17 : des lymphocytes T CD8⁺ producteurs d'IL-17

L'immunité de type 17 est constituée d'un autre type cellulaire, les Tc17 (**Figure 5**). De la même manière que pour les cellules T CD4⁺, il existait une dichotomie des cellules T CD8⁺ ou CTL entre deux sous-populations Tc1 et Tc2 (Mosmann *et al.*, 1995). Et pareillement aux lymphocytes T CD4⁺, il a été mis en évidence une troisième sous-population de CTL : les Tc17 qui produisent des cytokines de type 17 (IL-17, IL-21) et expriment des marqueurs caractéristiques du programme Th17 tels que ROR γ t et l'IL-23R (Kondo *et al.*, 2009). L'engagement des lymphocytes T CD8⁺ vers la voie effectrice Tc17 dépend des facteurs STAT-3 et ROR γ t et peut s'effectuer en présence de TGF β , d'IL-6 et ou d'IL-21.

Le rôle des Tc17 n'a pas été clairement établi, leur fréquence restant en effet très faible en comparaison avec celle des Th17 (T CD4⁺). Néanmoins, ces cellules qui sont détectables pendant les infections virales, les pathologies auto-immunes (ex. sclérose en plaque, MICI ou maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) et dans les tumeurs, auraient un rôle pathogénique (Yen *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2009).

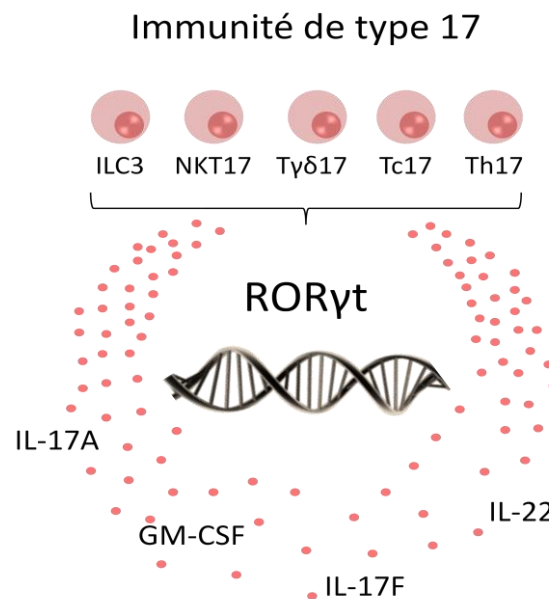


Figure 5 Représentation des sous-populations cellulaires de la famille ROR γ t. Elles ont toutes en commun l'expression du facteur de transcription ROR γ t et la sécrétion des cytokines IL-17 A/F, IL-22 et GM-CSF.

8. Importance des cellules ROR γ t⁺ dans l'immunité innée

Les cellules de l'immunité de type 17 ont des rôles clés au niveau des barrières épithéliales de la peau, des poumons, des cavités orales, du tractus gastro-intestinal et des voies génitales. Leur rôle est en lien direct avec les cytokines qu'elles sécrètent, principalement l'IL-17 et l'IL-22. Les ILC3 induisent une réponse immunitaire rapide suivie par la réponse Th17 qui est plus longue à se mettre en place mais est spécifique. Ces différentes populations cellulaires n'ont pas exactement les mêmes rôles mais il existe une redondance qui permet une compensation en l'absence d'une population. Notamment, il a été montré chez la souris (Song *et al.*, 2015) et chez l'homme (Vély *et al.*, 2016) que les fonctions des ILC peuvent être largement compensées si les cellules T et B sont présentes.

8.1. Homéostasie intestinale : un subtil équilibre

L'homéostasie intestinale résulte du maintien d'un équilibre immunologique entre les bactéries commensales constituant la flore intestinale et le système immunitaire de l'hôte. La muqueuse intestinale est constituée de trois couches : un épithélium directement en contact avec la flore, une couche conjonctive sous-jacente nommée lamina propria contenant les cellules immunitaires de l'hôte et un tissu musculaire profond ou muscularis mucosae. L'épithélium et la couche de mucus qui le recouvre sont la première ligne de défense de l'organisme qui agit, non seulement comme une barrière physique, mais qui régule également la colonisation par les bactéries commensales et leur diversité.

L'IL-22 sécrétée par les ILC3 au niveau de l'intestin joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie en empêchant une réponse immunitaire inappropriée contre le microbiote commensal et les antigènes environnementaux. Il a été observé que l'absence des ILC3 conduit à une translocation bactérienne dans les organes périphériques tels que la rate et le foie et peut également avoir pour conséquence la dissémination et l'implantation de bactéries dans l'épithélium ou les organes lymphoïdes (Sonnenberg *et al.*, 2012). L'IL-22 agit directement sur les cellules épithéliales (intestinal epithelial cells : IECs) en se liant à son récepteur qui est exprimé seulement sur ce type cellulaire. La liaison de l'IL-22 sur son récepteur entraîne une cascade de phosphorylation impliquant STAT3 et module ainsi l'expression des gènes des cellules épithéliales. Il a été montré que l'IL-22, en agissant sur les cellules souches intestinales, maintient et restaure la barrière épithéliale en induisant la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin. En effet, l'IL-22 agit directement sur les cellules souches intestinales, *in vitro* et *in vivo* et permet ainsi la régénération de l'épithélium intestinal (Lindemans *et al.*, 2015). L'IL-22 induit également la différenciation des cellules de Goblet spécialisées dans la sécrétion de mucus (Sugimoto *et al.*, 2008). De plus, en réponse à l'IL-22, les cellules épithéliales de l'intestin produisent une forte quantité de peptides antimicrobiens (PAMs) comprenant les protéines S100, les β -défensines et les protéines REG. Par exemple, la protéine REGIII γ maintient la ségrégation bactérienne en étant diffusée directement dans la couche de mucus. De plus, l'IL-22 induit la fucosylation des glucides associés aux cellules épithéliales. Ce processus favorise la croissance d'espèces commensales mutualistes adaptées à l'utilisation du fucose comme source d'énergie. Ainsi, ce processus leur confère un avantage pour concurrencer d'autres espèces pathogènes qui n'ont pas

cette capacité (Pham *et al.*, 2014; Pickard *et al.*, 2014). Il permet par exemple de lutter contre l'infection à *Salmonella typhimurium* (Klose et Artis, 2016).

8.2. Impact du régime alimentaire dans la tolérance intestinale

Comme discuté dans la partie précédente, il existe un lien étroit entre le système immunitaire, notamment les ILC3 et les bactéries commensales du tractus intestinal. Il existe également un lien entre la régulation des ILC3 et le régime alimentaire. En effet, le facteur de transcription AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) induit par le tryptophane est requis pour le maintien de la sécrétion de l'IL-22 (Kiss *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). De même, chez la souris, une carence en vitamine A dans l'alimentation a pour conséquence un nombre anormalement faible d'ILC3, un déficit de la production en IL-22 et une plus grande sensibilité à l'infection par *Citrobacter rodentium* (Spencer *et al.*, 2014).

L'acide rétinoïque est un dérivé de la vitamine A qui est produit principalement par les DCs (dans la lamina propria), favorise l'expression de récepteurs de « homing » pour l'intestin par les ILC1 et ILC3 (Kim, Taparowsky et Kim, 2015) et améliore la fonction des ILC3 en augmentant l'expression de ROR γ t et de l'IL-22 (Mielke *et al.*, 2013). A l'inverse, il a été montré que l'acide rétinoïque diminue la prolifération des ILC2. Autrement dit, en période de carence en vitamine A, le nombre d'ILC2 augmente et peut influencer la réponse immunitaire médiée par les ILC en modifiant la balance ILC1/3 et ILC2. Ainsi, le régime alimentaire de l'hôte peut fortement influencer les ILC et les réponses immunitaires spécifiques de chaque sous-population.

8.3. Les cellules de l'immunité de type 17 orchestrent la réponse immunitaire

Les cellules produisant l'IL-17A et F ont, de façon indirecte, une grande capacité de recrutement des cellules immunitaires, en particulier les neutrophiles. En effet, l'IL-17 induit l'expression de G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) et de l'IL-8 par les cellules épithéliales, ce qui conduit au recrutement de neutrophiles. Ces cellules pourront alors phagocyter les cellules infectées dans le tissu épithélial. Les Th17 jouent un rôle crucial dans ce processus. L'IL-17 induit également la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui améliorent l'accessibilité à la matrice extracellulaire et ainsi facilitent le recrutement des autres types cellulaires (Veldhoen, *et al.*, 2017). Ce recrutement permet de

potentialiser la réponse immunitaire, chaque type cellulaire ayant une fonction et un rôle spécifiques.

8.4. Défense de l'hôte contre les pathogènes extracellulaires

Les cellules de l'immunité de type 17 sont spécialisées dans la défense de l'organisme contre les pathogènes extracellulaires bactériens et fongiques. Les barrières épithéliales sont le premier point d'entrée des microorganismes dans l'organisme. Comme je l'ai décrit précédemment, la réponse immunitaire dominée par l'IL-17 a pour premier but de contenir les micro-organismes ou de les maintenir à l'extérieur de la barrière épithéliale en la renforçant et en sécrétant des peptides antimicrobiens. Lorsque la barrière épithéliale est lésée, les DCs présentes dans le tissu immunitaire sous-jacent s'activent et sécrètent des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-1 β qui vont induire la sécrétion d'IL-17 par les cellules $\gamma\delta$ au niveau de la peau et la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 par les ILC3 dans l'intestin. La sécrétion d'IL-17 et l'IL-22 est impliquée dans la protection contre les infections par les bactéries extracellulaires et à Gram négatif telles que *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter rodentium* et *Mycobacterium tuberculosis* (Veldhoen, *et al.*, 2017). Elles sont également impliquées dans la réponse aux infections fongiques par *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* et au rotavirus.

Des lésions de la barrière épithéliale intestinale comme c'est le cas dans les MICI, entraînent une voie d'entrée des micro-organismes. En conséquence, il y a une translocation globale des bactéries pathogènes et commensales dans la muqueuse. Les cellules ROR γ t⁺ ont un rôle crucial dans la réparation de cet épithélium et dans le contrôle de l'inflammation. Chez la souris, un modèle chimique de colite aiguë mime ce phénomène. Il s'agit du DSS (dextran sodium sulfate), administré aux animaux dans l'eau de boisson pendant cinq à sept jours. Ce composé induit des lésions de la muqueuse intestinale, essentiellement au niveau du colon et du rectum des animaux traités (Chassaing *et al.*, 2014; Wirtz *et al.*, 2017). Ce modèle est caractérisé par deux phases :

- Une phase initiale d'atteintes de la muqueuse intestinale: lors de cette étape, le DSS provoque l'apparition de lésions tissulaires et l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal (perte de poids).
- Une phase secondaire de réparation tissulaire : le processus de restauration de l'épithélium intestinal se met en place et conduit au retour à un état

homéostatique. L'amélioration clinique (reprise de poids) n'est observable que plusieurs jours après l'arrêt du traitement (\pm 10 jours après le début du traitement).

Dans ce modèle, l'IL-22 et l'IL-17 sont des cytokines clés. Il a été mis en évidence une augmentation de la production de l'IL-22 dans le colon au cours du traitement au DSS (Zenewicz *et al.*, 2008). L'implication de cette cytokine dans la réparation de l'épithélium au cours de la colite a clairement été montrée en utilisant des souris déficientes pour l'IL-22. Ces souris perdent plus de poids et ont une mortalité plus importante (Sugimoto *et al.*, 2008; Zenewicz *et al.*, 2008). De manière intéressante, les souris double déficientes RAG1 et IL-22 sont plus susceptibles au DSS que les souris RAG1 (Zenewicz *et al.*, 2008). Dans ces souris, l'IL-22 produite au cours de la colite est sécrétée par des cellules innées, c'est à dire les ILC3. Cependant, lorsque les cellules Th17 sont présentes, l'absence des ILC3 n'impacte pas le phénotype des souris (Song *et al.*, 2015). Il y a donc une compensation entre les cellules Th17 et les ILC3.

L'IL-17 est également une cytokine protectrice dans le modèle de DSS. En effet, sa neutralisation par un anticorps ou l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-17, ont montré une augmentation des dommages tissulaires (Ogawa *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2015). L'équipe de Daniel Cua a mis en évidence que, lors de lésions de l'épithélium, l'IL-17A régule la localisation cellulaire de l'occludine, une protéine constitutive des jonctions serrées. Les jonctions serrées assurent la cohésion des épithéliums. Leur régulation par l'IL-17A permet donc de limiter l'augmentation de la perméabilité et de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale. De façon surprenante, dans cette étude, les cellules $\gamma\delta$ IL-23R⁺ seraient la source majoritaire d'IL-17A protectrice dans l'intestin lors de l'inflammation aiguë. D'autre part, les auteurs ont établi que la production d'IL-17A par ces cellules $\gamma\delta$ ne dépend pas de la présence d'IL-23 (Lee *et al.*, 2015). Ainsi, chez la souris, l'inhibition de l'IL-23 permet de préserver la libération d'IL-17A protectrice tout en limitant l'inflammation aiguë dans le modèle de colite au DSS. Ce dernier point est fondamental pour une meilleure compréhension et une amélioration des approches thérapeutiques actuelles.

Les ILC3 ont un rôle crucial dans la réponse précoce aux entéropathogènes comme *Citrobacter rodentium* chez la souris et *Escherichia coli* chez l'homme. Dans le modèle murin, le contrôle de l'infection fait appel aux ILC3 dans un premier temps, puis à la réponse Th17 (Collins *et al.*, 2014). Dans ce modèle de colite infectieuse, il a été mis en évidence que l'IL-6,

l'IL-23 et l'IL-22 sont sécrétées rapidement après l'inoculation du pathogène (Zheng *et al.*, 2008). A l'inverse, l'IL-17 est sécrétée plus tardivement, environ douze jours après l'inoculation. De façon intéressante, les souris déficientes pour l'IL-22 développent une forte pathologie avec une perte de poids importante et une faible survie (Satoh-Takayama *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). De la même manière, lorsque des souris reçoivent un anticorps anti-IL-22 le jour de l'inoculation, elles perdent du poids et la survie est nulle après douze jours. A l'inverse, lorsque des souris reçoivent l'anticorps au jour huit de l'infection, elles récupèrent complètement (Zheng *et al.*, 2008). Ainsi, l'IL-22 est cruciale au stade précoce de l'infection. Dans cette étude, il a également été montré que l'un des rôles de l'IL-22 dans le contrôle de la colite est l'induction de la sécrétion des peptides antimicrobiens REGIII β et REGIII γ par les cellules épithéliales. D'autre part, une autre étude a mis en évidence le rôle crucial de l'IL-17 dans le recrutement des neutrophiles au site de l'infection (Happel *et al.*, 2005).

De manière surprenante et à l'inverse des résultats précédents, en 2016, l'équipe d'Eric Vivier a montré que la production d'IL-22 par les ILC3 ne serait pas essentielle dans le contrôle de l'infection par *Citrobacter rodentium* en présence des cellules T (Rankin *et al.*, 2016). Par contre, lors d'un défaut des cellules T, les ILC3 sont cruciales dans la protection contre les infections. Le rôle de l'IL-22 dans la protection intestinale est indéniable, cependant, la participation des ILC3 et des Th17 dans ce rôle reste encore à éclaircir.

Dans le cas des infections fongiques, l'inflammation est nécessaire à la protection de l'hôte. Néanmoins, elle doit être contrôlée et de courte durée pour ne pas évoluer en pathologies. Pour illustrer cette dichotomie, le modèle d'infection par *Candida albicans* a été étudié. Il s'agit d'un pathogène commensal des cavités orales et du tractus gastro-intestinal qui peut devenir pathogénique en cas d'immunodéficiences. Chez l'homme, la forme disséminée de l'infection par *Candida albicans* est une infection nosocomiale dont le taux de mortalité est de 40%. Dans ce modèle, la sécrétion d'IL-17 par les Th17 est protectrice et agit en recrutant et en stimulant l'expansion de neutrophiles au site de l'infection. Par contre, les Th1 et l'IFN γ n'ont pas d'impact dans cette infection (Huang *et al.*, 2004). De manière similaire, l'IL-17 et l'IL-23 ont un rôle protecteur dans les infections pulmonaires par *Aspergillus fumigatus*.

Récemment, un rôle direct des ILC3 a été mis en évidence dans la réponse immunitaire précoce au pathogène *Mycobacterium tuberculosis* (Ardain *et al.*, 2019). La tuberculose est dans le monde, la première cause de décès due à une infection. Dans cette étude, les

auteurs ont montré une diminution des ILC dans le sang de patients atteints de tuberculose pulmonaire et, à l'inverse, une augmentation des cellules dans les poumons (Ardain *et al.*, 2019). Ils ont mis en évidence une accumulation d'ILC3 dans les poumons de souris infectées par le pathogène qui coïncide avec une accumulation de macrophages alvéolaires. Les ILC3 migrent donc du sang vers le lieu d'infection. De plus, il a été mis en évidence l'importance de l'IL-17 et de l'IL-22 ainsi que de l'axe CXCR5-CXCL13 dans le recrutement des ILC3 dans les poumons après l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

9. Rôle dans l'immunité adaptative

Les ILC3 sont des cellules de l'immunité innée dont les fonctions sont variées et majoritairement associées à une réponse immunitaire innée en renforçant la barrière épithéliale et en recrutant d'autres acteurs cellulaires. Plus récemment, il a été mis en évidence que ces cellules peuvent, par des signaux dépendants ou indépendants des cytokines qu'elles sécrètent, influencer les réponses adaptatives T et B.

9.1. Les IgA

Les IgA ont un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Elles sont sécrétées par les lymphocytes B et traversent la barrière épithéliale. Ces IgA ont la capacité de neutraliser les toxines bactériennes, d'inhiber l'adhérence des bactéries sur les cellules épithéliales et donc de contenir et de contrôler la flore commensale. Elles sont également capables d'inhiber l'absorption des antigènes solubles et particuliers en formant des complexes immuns dans la lumière intestinale (Mestecky, Russell et Elson, 1999). Il a été montré que l'homme produit chaque jour plusieurs grammes d'IgA dans son tractus digestif. Les LTi-like ILC3 ont été associées au maintien de cette production d'IgA. En effet, il a été montré que ces cellules sont indispensables à la génération des organes lymphoïdes secondaires associés à l'intestin, qui sont les plaques de Peyer, les cryptopatches et les follicules lymphoïdes isolés (ILFs) dans lesquels la réponse IgA est induite (Penny, Hodge et Hepworth, 2018). Les ILC3 et les LTi-like ILC3 sécrètent deux types de lymphotoxines, produites sous une forme soluble ou liée à la membrane : les lymphotoxines α (LT α) et les lymphotoxines β (LT β). Il a été mis en évidence que la lymphotoxine soluble sLT α_3 peut réguler la production des IgA dépendante des cellules T, en régulant le « homing » des cellules T vers l'intestin (Kruglov *et al.*, 2013). Par ailleurs, la lymphotoxine LT $\alpha_1\beta_2$ qui se lie à

la membrane est cruciale pour l'induction et la commutation de classe des IgA, de manière T indépendante. Les DCs provenant de la lamina propria des souris déficientes pour cette lymphotoxine sont moins aptes à induire la production des IgA *in vitro* (Kruglov *et al.*, 2013). De plus, dans les ganglions mésentériques des souris déficientes, le niveau d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) dans les DCs est diminué (Kruglov *et al.*, 2013). Il est connu que l'iNOS est un important inducteur de la sécrétion d'IgA (Fritz *et al.*, 2012). Ainsi, les lymphotoxines peuvent influencer la production d'IgA par l'interaction directe des ILC3 et des DCs (Reboldi *et al.*, 2016).

9.2. Rôle des molécules du CMH de classe II dans les ILC3

En 2013, l'équipe de Grégory Sonnenberg, a mis en évidence une caractéristique surprenante des ILC3 (Hepworth *et al.*, 2013). En utilisant des souris déficientes pour le facteur de transcription ROR γ t, les auteurs ont observé une augmentation de la prolifération des cellules T CD4⁺ effectrice et effectrice/mémoire ainsi qu'une splénomégalie traduisant une perturbation de l'homéostasie cellulaire. De façon importante, lorsque les ILC3 sont spécifiquement délétées et que les Th17 sont intacts, le même phénotype a été observé. Autrement dit, les ILC3 pourraient avoir un rôle critique dans la régulation de la réponse immunitaire inflammatoire dirigée contre les bactéries commensales, et ce de manière indépendante à l'IL-17, l'IL-22 et l'IL-23. De manière surprenante, il a été mis en évidence que ces cellules expriment fortement des gènes associés à l'apprêtement de l'antigène et à la présentation des peptides par le CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité) (Hepworth *et al.*, 2013). Généralement, ces gènes sont associés aux cellules présentatrices d'antigènes comme par exemple les DCs. Ces résultats ont été confirmés en montrant que les ILC3 expriment la molécule du CMH II à leur surface et sont capables d'apprêter et de présenter les antigènes. De plus, lorsque la molécule de CMH de classe II est spécifiquement délétée dans les ILC3, les souris sont atteintes d'une inflammation intestinale spontanée. Ainsi, les ILC3 n'induisent pas la prolifération des lymphocytes T CD4⁺. Au contraire, elles agissent en limitant la réponse T CD4⁺ dirigée contre les bactéries commensales et permettent le maintien de l'homéostasie intestinale (Hepworth *et al.*, 2013).

Plus récemment, il a été mis en évidence que les ILC3 exprimant le CMH de classe II seraient impliquées dans la régulation des interactions entre les cellules Tfh (T follicular helper) et les lymphocytes B dans les ganglions mésentériques (Melo-Gonzalez *et al.*, 2019). Cette

régulation permettrait de limiter la sécrétion d'IgA et ainsi de maintenir l'homéostasie intestinale et le mutualisme avec le microbiote commensal.

9.3. Expression du gène *Aire*

Récemment, l'équipe de Dominik Filipp, a mis en évidence une population cellulaire présente dans les ganglions périphériques et exprimant *Aire* (autoimmune regulator) (Yamano *et al.*, 2019). Le gène *Aire* est fortement exprimé dans les cellules mTec (medullary thymic epithelial cells), les cellules épithéliales de la medula du thymus et est impliqué dans la tolérance périphérique du soi. Cette équipe a mis en évidence que cette population cellulaire $Aire^+$ présente les caractéristiques des cellules LTI-like ILC3. En effet, elles présentent une morphologie similaire et sont dépendantes du facteur de transcription ROR γ t. Une analyse en RNA-sequencing a révélé une signature spécifique des $Aire^+$ LTI-like ILC3. De manière intéressante, cette analyse a également mis en évidence que ces cellules présentent une forte expression du CMH II et des molécules de co-stimulation. De plus, ces cellules sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T CD4 $^+$. Ainsi, cette nouvelle population cellulaire $Aire^+$ LTI-like ILC3 présente des caractéristiques des APCs et pourrait orchestrer la réponse T CD4 $^+$ (Yamano *et al.*, 2019). Néanmoins, l'importance physiologique de cette fonction reste à établir par l'utilisation de systèmes génétiques spécifiques ou de stratégies sélectives de déplétion.

9.4. Sécrétion d'IL-2 dans l'intestin

Un autre facteur pouvant permettre la régulation de la réponse adaptative et la tolérance des bactéries commensales est les lymphocytes T régulateurs. Il est connu que l'IL-2 est impliqué dans la génération et le maintien de ces cellules. Néanmoins, au niveau du tractus gastro-intestinal, les voies moléculaires impliquées dans la production d'IL-2 ne sont pas définies. De manière intéressante, chez la souris, la délétion de l'IL-2 spécifiquement dans les cellules T n'induit pas une diminution de la génération de cellules Treg (Zhou *et al.*, 2019). Les cellules T étant les cellules sécrétrices d'IL-2, il était pertinent d'imaginer que de les bloquer diminuerait l'induction des Treg. Dans cet article, les auteurs ont montré que, dans l'intestin, la principale source d'IL-2 est les ILC3. Cette sécrétion est induite spécifiquement par l'IL-1 β produit par les macrophages. Ainsi, l'IL-2 produite par les ILC3 est

essentielle pour le maintien de l'homéostasie et la tolérance envers les antigènes alimentaires.

Les ILC ont différents rôles dans le système immunitaire lié aux muqueuses. Ces fonctions sont aussi bien dirigées vers les cellules de l'immunité innée que de l'immunité adaptative. Elles jouent donc un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie et la défense de l'hôte contre les pathogènes.

10. Pathologies associées aux cellules de l'immunité de type 17

10.1. Les MICI

Nous venons de voir les différentes fonctions connues des cellules de l'immunité de type 17 et leur rôle crucial dans la protection de l'organisme. Néanmoins, ces cellules sont également impliquées dans plusieurs pathologies auto-immunes et elles peuvent alors être ciblées par des traitements pour diminuer leurs effets néfastes.

Des pathologies fortement associées aux cellules de l'immunité de type 17 sont les MICI ou maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Deux pathologies centrales dans les MICI sont la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Elles sont caractérisées par une inflammation de la muqueuse touchant différentes parties du tube digestif, de la bouche à l'anus selon la pathologie. Cette inflammation est due à une réponse immunitaire non contrôlée, dirigée contre les bactéries commensales. Ces pathologies ont émergé dans les pays occidentaux dans un premier temps puis, plus récemment, elles émergent dans les pays nouvellement industrialisés tels que la Chine et l'Inde (Kaplan *et al.*, 2015). Ceci explique que des facteurs environnementaux ont été associés. Par exemple l'hygiène et le tabac, bien que ces facteurs puissent avoir des effets inverses dans la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique (Kaplan *et al.*, 2015). Des facteurs génétiques ont également été associés à ces pathologies. Par exemple, une analyse pangénomique chez l'homme (GWAS : genome wide association study) a identifié des SNP (single nucleotide polymorphism) du gène *il23r* comme facteurs de prédisposition aux MICI (Duerr *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que l'IL-23 aurait des effets néfastes dans ces pathologies. En effet, les souris déficientes pour l'IL-23 et l'IL-23R sont moins susceptibles au modèle de colite au DSS (Cox *et al.*, 2012). Des essais cliniques ciblant l'IL-23 seul ou l'IL-23 et l'IL-12 montrent des résultats prometteurs. L'utilisation d'un anticorps bloquant spécifique de l'IL-23 (MEDI2070) ou de la sous-unité p40

(Usketinumab) a montré une amélioration des symptômes, associée à une augmentation de l'IL-22 dans le sérum des patients traités (Sands *et al.*, 2017; Wong et Cross, 2019). Une autre cytokine associée aux MICI est l'IL-17, qui est fortement produite dans l'intestin. Une forte infiltration des Th17 a été mise en évidence, associée à une forte sécrétion d'IL-17A (Gálvez *et al.*, 2014). Néanmoins, son rôle n'est pas complètement compris. Par exemple, certaines études ont montré, dans le modèle de DSS, que cette cytokine est protectrice puisque les souris déficientes développent une colite plus forte (Ogawa *et al.*, 2004). A l'inverse, d'autres études ont montré que le blocage de la cytokine est bénéfique dans le contrôle de la colite. Par exemple, le vidofludimus qui inhibe la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes T CD4⁺ activés, serait positif dans la colite au DSS (Fitzpatrick *et al.*, 2010). Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, il a été montré une augmentation de la sécrétion d'IL-17A (Geremia et Arancibia-Cárcamo, 2017). Pourtant, un essai clinique utilisant l'anticorps bloquant anti-IL17A nommé Secukinumab n'a pas montré d'effets positifs du blocage de la cytokine (Hueber *et al.*, 2012). Une autre approche thérapeutique a été proposée par Grégory Sonnenberg et son équipe. Ils ont mis en évidence qu'une molécule (nommé GSK805) qui inhibe ROR γ t pourrait, dans l'intestin, agir de manière différente sur les Th17 et ILC3 (Whiters *et al.*, 2016). En effet, dans cette étude, il a été montré que l'injection de ce traitement diminue le nombre de cellules T IL-17⁺ et IL-22⁺. A l'inverse, le nombre d'ILC3 n'est pas modifié. L'administration de ce traitement dans le modèle de colite *Citrobacter rodentium* permet la survie de 75% des souris au jour 20 (100% pour le contrôle). Ainsi, le maintien de la réponse innée seule permettrait de contenir l'infection pour 75% des animaux. Ces résultats ont été confirmés dans un autre modèle murin. L'utilisation de ce traitement chez des souris IL-10 déficientes qui développent spontanément une colite a confirmé la diminution des Th17, le maintien des ILC3 et une atteinte moins importante du colon que chez les souris contrôles (Whiters *et al.*, 2016). Ainsi, l'inhibition transitoire de ROR γ t pourrait avoir des bénéfices thérapeutiques. Pour confirmer ces résultats chez l'homme, des biopsies de patients atteints de maladie de Crohn ont été digérées et les cellules obtenues ont été mise en culture *in vitro*. L'ajout de la molécule GSK805 pendant 12h a induit une diminution des cellules T produisant l'IL-17 et l'IL-22 mais pas des ILC3. Le blocage de ROR γ t dans les MICI pourrait alors permettre d'inhiber les Th17 pathogéniques et de maintenir les ILC3 protectrices. Ces résultats posent également la question de comprendre comment deux populations cellulaires qui ont des

profils transcriptionnels similaires peuvent être modulées par un facteur de transcription commun.

10.2. Le psoriasis

Le psoriasis est une pathologie chronique de la peau qui touche 2 à 3% de la population mondiale. Cette maladie est caractérisée par des lésions cutanées au sein desquelles on observe une prolifération excessive (acanthose) et une différenciation aberrante des kératinocytes ainsi que des infiltrats de lymphocytes T et B, de neutrophiles et de DCs. Comme pour toutes les maladies inflammatoires et auto-immunes, la susceptibilité d'un individu face au développement de cette maladie dépend d'une conjonction entre des facteurs environnementaux facilitateurs et des prédispositions génétiques. Cette pathologie a clairement été associée aux cytokines IL-17A/F et à l'IL-22, sécrétés non pas par les Th17 mais par les $\gamma\delta 17$ (Pantelyushin *et al.*, 2012). Le blocage de l'IL-23/IL-12 par un anticorps spécifique de la sous-unité p40 (Ustekinumab) a montré une forte diminution des symptômes. De manière intéressante, l'utilisation d'un anticorps anti-IL-17, le Secukinumab a montré de meilleurs effets bénéfiques et est actuellement utilisé en traitement chez les patients (Thaçi *et al.*, 2015). L'IL-22 est également impliquée dans le psoriasis. Un essai clinique récent utilisant un anticorps anti-IL-22, le Fezakinumab, a montré une amélioration des symptômes des patients (Guttman-Yassky *et al.*, 2018). Dans notre équipe, un groupe s'intéresse à l'IL-22BP, qui est l'inhibiteur spécifique de l'IL-22. Cette molécule est produite par les DCs (Martin *et al.*, 2017). Ce groupe a montré que, chez les patients atteints de psoriasis, la sécrétion d'IL-22 est fortement augmentée alors que l'expression de l'IL-22BP est inchangée (Martin *et al.*, 2017). Autrement dit, il y a une modification du ratio IL-22/IL-22BP et l'IL-22 n'est plus contrôlée par son inhibiteur. Pour comprendre l'impact de l'IL-22BP dans le psoriasis, un modèle de dermatite ectopique induit par la crème Aldara™ a été utilisé. Les rats déficients pour l'IL-22BP montrent une aggravation des symptômes en comparaison aux animaux contrôles. Pour confirmer ces résultats, l'administration d'un anticorps bloquant anti-IL-22BP chez des souris aggrave les symptômes en comparaison aux animaux traités avec un isotype (Martin *et al.*, 2017). Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'IL-22BP pour contrôler l'IL-22 dans le psoriasis et le potentiel thérapeutique de l'IL-22BP.

10.3. La spondylarthrite ankylosante

La spondylarthrite ankylosante est une maladie inflammatoire chronique des articulations et peut se développer chez les patients atteints de MICI ou de psoriasis. De la même manière que pour les pathologies précédentes, l'axe IL-23/IL-17 a été mis en cause dans la spondylarthrite ankylosante (Smith *et al.*, 2015). Dans un premier temps, ces cytokines ont été mises en cause en réalisant des analyses GWAS, puis ces résultats ont été confirmés par l'augmentation de l'IL-23 et de l'IL-17 dans le sang et les tissus squelettiques des patients (Smith *et al.*, 2015). L'utilisation de l'Ustekinumab qui cible la sous-unité p40 a montré une amélioration des symptômes, tout comme le Secukinumab qui cible l'IL-17 (Baeten *et al.*, 2015).

Dans ces différentes pathologies, l'axe IL-23/IL-17/IL-22 a un rôle pathogénique. Beaucoup de progrès dans le traitement de ces pathologies ont été réalisés notamment avec l'utilisation d'anticorps bloquants l'IL-23 ou l'IL-17. Néanmoins, le fait que ces anticorps bloquants puissent être bénéfiques dans certaines pathologies et délétères dans d'autres, met en évidence que ces cytokines sont un subtil équilibre entre un rôle protecteur et un rôle pathologique.

Ainsi, l'immunité de type 17, les cellules et les cytokines produites ont été mise en évidence il y a moins de vingt ans. Depuis, son rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des muqueuses, notamment au niveau de l'intestin, et la défense de l'hôte contre les pathogènes extracellulaires, a mis en avant ses fonctions protectrices. Néanmoins, ces cellules peuvent également avoir des rôles néfastes dans de nombreuses pathologies auto-immunes. De nombreux acteurs moléculaires restent à découvrir pour mieux comprendre le fonctionnement et la régulation de l'immunité de type 17. Une partie importante de mon travail de thèse s'est ainsi portée sur le rôle des gènes *Tmem176a* et *Tmem176b* dans la biologie des cellules ROR γ ⁺.

Ces gènes étant également fortement exprimés dans les DCs, ces cellules fonctionnellement très différentes des cellules ROR γ ⁺, ont fait l'objet de l'autre partie majeure de mon travail.

B. Les cellules dendritiques : premier acteur dans la réponse immune adaptative

1. Initiation de la réponse immunitaire adaptative

Le système immunitaire présente une composante innée, non spécifique, dont la réponse est rapide et une composante adaptative, spécifique d'un antigène qui doit être activée et est plus longue à se mettre en place. La réponse immunitaire adaptative est médiée par les lymphocytes T et les lymphocytes B.

Une question primordiale est : Quelle cellule assure le lien entre l'immunité innée et adaptative ? Comment les lymphocytes B et T situés principalement dans les organes lymphoïdes peuvent-ils être activés par des pathogènes envahissant les tissus périphériques ? Ce lien, ce sont les DCs qui font partie des cellules présentatrices d'antigènes. Les APCs regroupent schématiquement trois populations cellulaires : les DCs, les macrophages et les lymphocytes B. Parmi ces populations, les DCs sont relativement beaucoup plus rares en fréquence mais sont les plus compétentes et surtout les seules à être capables d'activer les lymphocytes T naïfs et donc d'initier une réponse primaire. Ces cellules ont une forte capacité d'internalisation et de dégradation des protéines, exogènes ou endogènes. Ces protéines sont dégradées en peptides qui sont ensuite présentés à la surface des DCs liés au CMH. Les peptides liés au CMH de classe I activent les lymphocytes T $CD8^+$ et les peptides liés au CMH de classe II, les lymphocytes T $CD4^+$ (**Figure 6**).

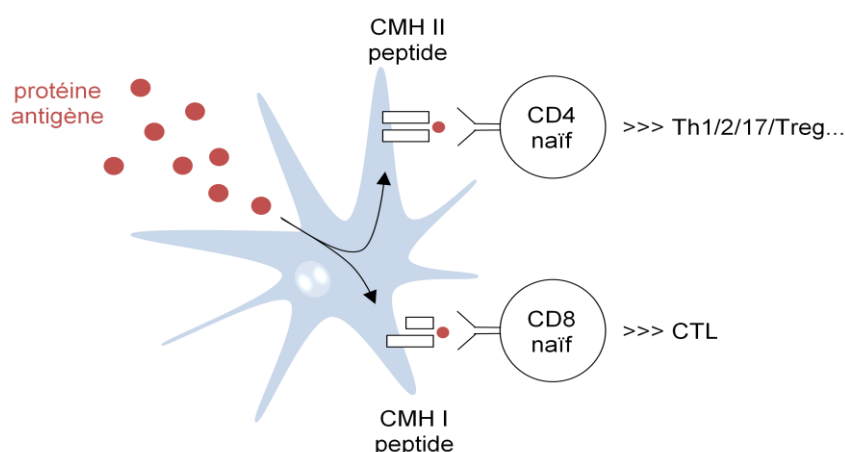


Figure 6 Les DCs captent les antigènes et les dégradent en peptides. Ces peptides sont ensuite chargés sur la molécule du CMH II et activent les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs ou sur la molécule du CMH I et activent les lymphocytes T $CD8^+$ (cross-présentation). Les T $CD4^+$ activés se différencieront en cellules Th1/2/17/Treg selon l'environnement cytokinique et les lymphocytes T $CD8^+$ deviendront des CTL.

Les DCs captent puis exposent à leur surface les antigènes de façon constante, peu importe leur localisation dans l'organisme. Ces antigènes peuvent être du Soi ou d'origine pathogène. Les antigènes du Soi n'induiront pas une réponse effectrice, grâce à la tolérance centrale et à la sélection négative dans le thymus. Par contre, s'ils sont issus de cellules infectées ou altérées, ils déclencheront une réponse immunitaire. L'activation des lymphocytes T naïfs par les DCs a principalement lieu dans les organes lymphoïdes secondaires incluant les ganglions et la rate. Elle peut être induite par des DCs migratoires qui captent les antigènes en périphérie puis migrent ensuite vers les organes lymphoïdes. L'activation des cellules T peut également être induite par les DCs résidentes des organes lymphoïdes qui captent les antigènes filtrés à travers ces organes. De manière intéressante, il a été mis en évidence que les DCs migratoires ne présentent pas les antigènes directement aux lymphocytes T. Les antigènes sont transférés aux DCs résidentes des organes lymphoïdes pour les présenter aux lymphocytes T (Allan *et al.*, 2006). Les mécanismes de ce transfert ne sont pas entièrement compris et plusieurs hypothèses ont été formulées : les DCs migratoires pourraient mourir et être captées par les DCs résidentes, elles pourraient produire des exosomes ou directement les antigènes sous forme soluble (Mueller, 2017). Les cellules T criblent les complexes CMH/peptide à la surface des DCs grâce à leur TCR. La reconnaissance spécifique et l'interaction du TCR d'une cellule T avec un complexe CMH/peptide à la surface d'une DCs et les signaux moléculaires qui en résultent, constituent le signal 1 d'activation des cellules T naïves. Un deuxième signal est nécessaire à l'activation et à la prolifération des cellules T, le signal de co-stimulation. Ce signal consiste en l'interaction entre des récepteurs de la membrane de la cellule T et leurs ligands à la surface de la DC. Le système de co-stimulation le plus important est constitué des molécules B7-1 et B7-2 (CD80 et CD86) sur les APCs et du CD28 sur les cellules T. En retour de leur activation, les cellules T fournissent également un signal de co-stimulation aux DCs (survie et production de cytokines) à travers notamment l'axe CD40L-CD40. Les cytokines sécrétées par les DCs, selon le stimulus qu'elles ont reçu, permettent ensuite la polarisation des cellules activées. Notamment les lymphocytes T CD4⁺ qui peuvent se différencier en Th1, Th2, Th17 ou Treg selon l'environnement cytokinique. Ces signaux vont permettre l'activation puis l'expansion des cellules T spécifiques de l'antigène.

Dans cette partie, la fonction des DCs sera détaillée ainsi que l'activation des lymphocytes T. Les mécanismes de présentation des antigènes seront définis plus précisément.

2. Découverte des cellules dendritiques

Les premières DCs ont été identifiées en 1868 par Paul Langerhans. Elles ont été mises en évidence dans la peau et nommées du nom de ce médecin, cellules de Langerhans (LC) (Silvano, *et al*, 2015).

Ce n'est qu'un siècle après cette découverte que ces cellules ont été mieux caractérisées. Plusieurs lignes de recherche ont permis l'identification des DCs. Dans un premier temps, les travaux de Donald Mosier en 1967, ont mis en évidence deux populations, issues de la rate, capables d'induire la production d'anticorps *in vitro* : des cellules adhérentes et non adhérentes. Ce sont les années 1970 qui marquent l'essor des connaissances sur ces cellules. Des études en microscopie dans les organes lymphoïdes ont mis en évidence des cellules de forme dendritique dans la zone T-dépendante (Veldman, 1970; Kaiserling et Lennert, 1974). Les auteurs ont également observé que ces cellules ont des extensions cytoplasmiques qui entrent en contact avec d'autres cellules immunitaires. Puis, ce sont les travaux du groupe de Ralph Steinman qui ont permis l'identification et la caractérisation des DCs de la rate. En 1973, son équipe a analysé les différentes populations cellulaires de la rate, en fonction de leur capacité à adhérer et de leur description en microscopie (Steinman et Cohn, 1973). Par exemple, ils identifiaient les granulocytes par leur noyau en forme de « doughnut ». Ils ont ainsi identifié un nouveau type de cellules nucléées adhérente, présentant des pseudopodes de longueurs et de formes variables. Ces cellules sont présentes sous diverses formes, allongée, étoilée ou dendritique (Steinman et Cohn, 1973) d'où le nom de « cellules dendritiques ». Elles représentent environ 1% des cellules nucléées de la rate (Steinman et Cohn, 1973). Leurs travaux ont permis de mettre au point un protocole permettant d'isoler les cellules à partir de la rate. Il a ainsi été mis en évidence que ces cellules ont une très forte capacité à induire la prolifération des lymphocytes lors d'une MLR (mix lymphocyte reaction), cent fois plus que les autres populations cellulaires (Steinman et Witmer, 1978) (Steinman *et al.*, 1980). Il a été montré qu'elles expriment une forte quantité de molécules de CMH de classe II (Steinman et Witmer, 1978) et ont un rôle de cellule accessoire, nécessaire à la prolifération des lymphocytes T (Klinkert *et al.*, 1980).

Chez l'homme, les DCs ont été isolées et caractérisées au début des années 1980. Des études fonctionnelles ont mis en évidence qu'elles ont la capacité de stimuler les

lymphocytes T (MLR) et de jouer un rôle de cellule accessoire pour leur prolifération, de manière similaire à la souris (Van Voorhis *et al.*, 1982).

Depuis ces premières découvertes, les DCs ont été caractérisées, leur phénotype, leur développement et surtout leur fonction cruciale dans l'immunité ont été mis en évidence. Ralph Steinman a reçu en 2011 le prix Nobel de médecine pour ses découvertes majeures sur ces cellules.

3. Ontogénie des cellules dendritiques

3.1. Généralités de la différenciation

Les DCs sont renouvelées en permanence. Elles se développent dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC). A partir de ces cellules souches, il existe deux voies de différenciation. Soit la cellule s'engage soit dans la lignée lymphoïde et se différencie en progéniteur commun lymphoïde (CLP), soit dans la lignée myéloïde en devenant un progéniteur commun myéloïde (CMP). Les Lymphocytes T, B et les cellules NK sont issus du CLP alors que les monocytes, macrophages et granulocytes se différencient à partir du CMP.

La mise en évidence de deux sous-populations de DCs, $CD11c^+CD8^+$ et $CD11c^+CD8^-$, que je décrirai en détails dans la partie suivante, suggérait à l'époque que les cellules $CD8^+$ étaient issues du CLP et les cellules $CD8^-$ du CMP. Cette hypothèse a été démentie par des expériences de transferts adoptifs de CLP ou de CMP, notamment par l'équipe d'Irving Weissman. Il a été montré que les différentes populations de DCs peuvent se développer à partir des deux précurseurs (Traver *et al.*, 2000). Cette capacité des DCs à se différencier à partir de deux précurseurs est unique dans le système immunitaire. Cependant, les DCs périphériques sont majoritairement issues du CMP alors que les cellules du thymus proviennent de manière égale du CMP et du CLP (Traver *et al.*, 2000) (Mende *et al.*, 2006).

3.2. Différenciation des cellules dendritiques

Chez la souris, le CMP se différencie en MDP commun aux DCs, monocytes et macrophages et est caractérisé par les marqueurs $Lin^-Sca^+Kit^{hi}Flt3^+M-CSFR^+$ (Fogg, *et al.*, 2006). Ce précurseur représente environ 0,5% des cellules de la moelle osseuse de la souris. Cette cellule peut alors devenir un cMOP à l'origine des monocytes, ce précurseur perd le marqueur FLT3 et donc le potentiel à induire des DCs. Le MDP peut également se

différencier en CDP à l'origine des DCs. Le CDP exprime les marqueurs $\text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{Kit}^{\text{int}} \text{Flt3}^+ \text{M-CSFR}^+$. Le CDP conserve les marqueurs de DCs, FLT3 et M-CSFR mais perd le potentiel à induire les monocytes. Le CDP est d'une part, à l'origine des cellules dendritiques conventionnelles (cDCs), en se différenciant en pré-DC (Liu *et al.*, 2009) (Puhr *et al.*, 2015). La cellule pré-DC exprime les marqueurs $\text{Lin}^- \text{CD11c}^+ \text{Flt3l}^+ \text{M-CSFR}^- \text{Siglec-H}^+ \text{MHCI}^{\text{int}} \text{SIRP}\alpha^{\text{lo}}$ et donnera le pré-DC1 et le pré-DC2 à l'origine des deux sous-populations de cDCs (Liu *et al.*, 2009). Les cDCs achèvent leur différenciation en périphérie, elles sortent de la moelle osseuse pour rejoindre la rate et les autres tissus lymphoïdes puis se différencieront en $\text{CD8}^+ \text{cDC1}$ ($\text{CD11c}^+ \text{CD8}^+ \text{XCR1}^+ \text{CD103}^+$) et $\text{CD11b}^+ \text{cDC2}$ ($\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+ \text{SIRP}\alpha^+ \text{DC-SIGN}^+$) (Schlitzer *et al.*, 2015)(Grajales-Reyes *et al.*, 2016). D'autre part, le CPD peut se différencier en pré-pDC pour générer les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Le pré-pDC exprime les marqueurs $\text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{Kit}^{\text{int}} \text{Flt3l}^+ \text{M-CSFR}^-$, il conserve le marqueur FLT3 mais perd le récepteur au M-CSF (Onai *et al.*, 2013). Les pDC se développent complètement dans la moelle osseuse et migrent ensuite dans les tissus. Récemment, une étude a mis en évidence, que les pDC se développeraient en fait majoritairement à partir du progéniteur lymphoïde commun IL-7R^+ (Rodrigues *et al.*, 2018). Les marqueurs SiglecH et Ly6D caractérisent les pDC au sein de la lignée lymphoïde. L'analyse transcriptionnelle des précurseurs $\text{SiglecH}^+ \text{Ly6D}^+$ a mis en évidence la nécessité de l'expression du facteur IRF8 pour la différenciation des pDCs. Dans cette étude, il a également été montré que les pDCs issus de la lignée lymphoïde sont capables de produire l'IFN de type 1, comme les pDCs d'origine myéloïde, mais ne sont pas capables d'apprêter et de présenter les antigènes (Rodrigues *et al.*, 2018). Ainsi les voies de différenciation des DCs bien que fortement étudiées ne sont encore que partiellement définies (**Figure 7**).

La génération des DCs humaines est similaire à celle chez la souris. Chez l'homme, le GMDP ($\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD10}^- \text{CD45RA}^+ \text{FLT3}^+ \text{CD123}^+ \text{M-CSFR}^-$) se différencie en granulocytes ou en précurseurs des monocytes et des DCs, le MDP (Puhr *et al.*, 2015). Ensuite ce précurseur se différencie en CDP ($\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD10}^- \text{CD45RA}^+ \text{FLT3}^+ \text{CD123}^{\text{hi}} \text{M-CSFR}^-$), à partir duquel sont générés les pDCs ou le pré-cDC ($\text{Lin}^- \text{CD34}^- \text{CD45RA}^+ \text{CD117}^+ \text{FLT3}^+ \text{CD116}^+ \text{CD123}^+ \text{M-CSFR}^-$). Les sous-populations de cDCs finiront leur différenciation à partir du pré-cDC en périphérie pour donner les cDC1 ($\text{CD11c}^+ \text{BDCA3}^+ \text{XCR1}^+ \text{CD205}^{\text{hi}}$) et les cDC2 ($\text{CD11c}^+ \text{BDCA1}^+$) (Puhr *et al.*, 2015).

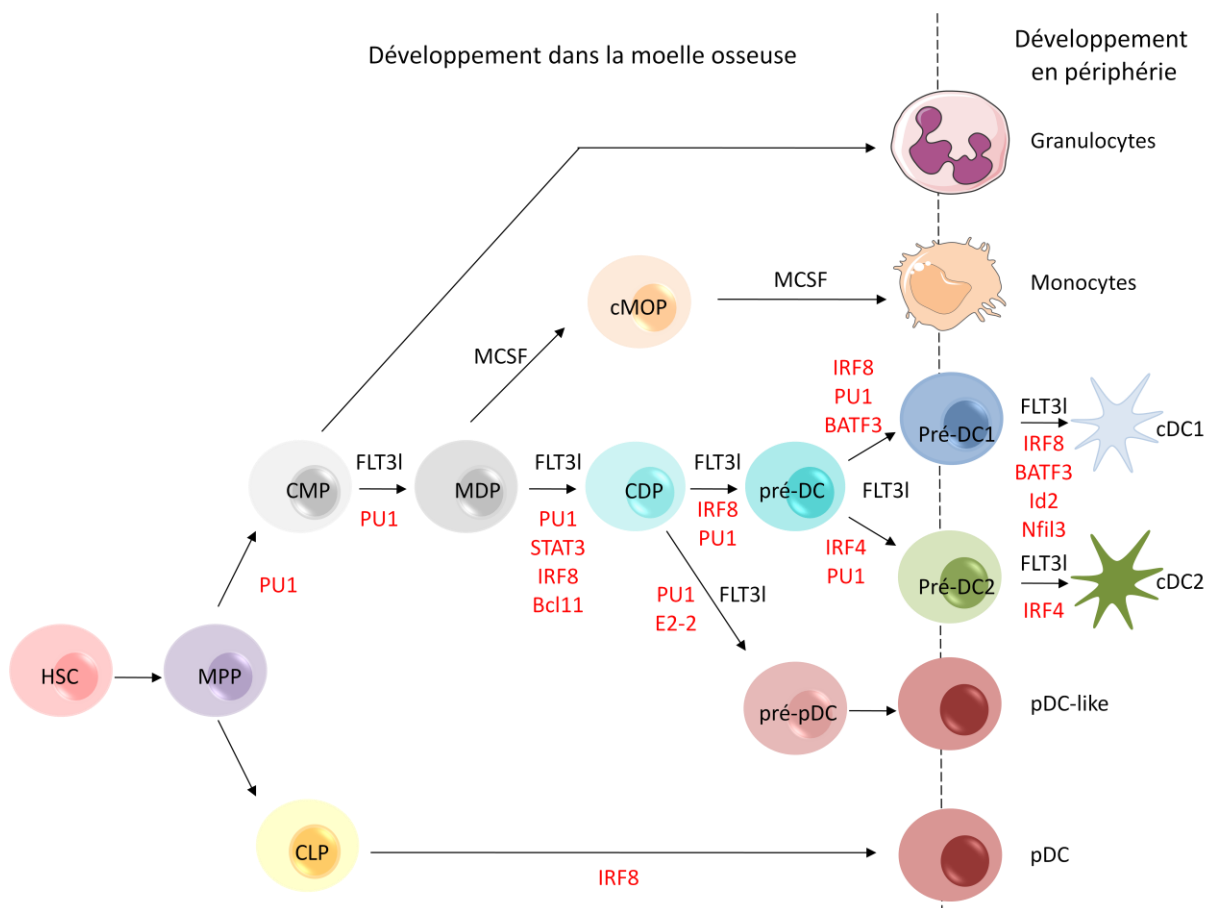


Figure 7 Le développement des DCs chez la souris se déroulent dans la moelle osseuse. Pour les cDCs ce développement se termine en périphérie. Les étapes dans ces voies de différenciation sont induites par des facteurs de transcription et des cytokines spécifiques.

3.3. Les cytokines clés dans la différenciation des cellules dendritiques

Deux cytokines sont cruciales dans le développement des DCs : le FLT3I (fms-like tyrosine kinase 3 ligand) et le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulation factor).

Le FLT3 ou CD135 est exprimé par les progéniteurs des DCs ainsi que par les cDC matures. Le FLT3I a été mis en évidence comme un fort stimulus de la prolifération des cellules souches et du développement des DCs (Lyman *et al.*, 1993; Maraskovsky *et al.*, 1996) (Figure 7). Ainsi, l'ajout de cette cytokine dans le milieu de culture de cellules de la moelle osseuse de souris induit la différenciation d'un grand nombre de pDCs et de cDCs (Shalin *et al.*, 2005). A l'inverse, il a été montré que des souris déficientes pour le FLT3I ou pour son récepteur présentent une forte diminution des pDCs et des cDCs dans la rate, les ganglions et les tissus périphériques (McKenna *et al.*, 2000). Par contre, chez ces souris, le nombre de granulocytes et de monocytes n'est pas affecté, ce qui confirme le rôle de cette cytokine dans la différenciation des DCs.

De manière intéressante, les souris $FLT3^{f/f}$ et $FLT3^{-/-}$ ne présentent pas les mêmes symptômes. Les souris $FLT3^{f/f}$ ont un déficit plus important en DCs, ce qui suggère que cette cytokine pourrait se lier à un autre récepteur. L'équipe de Kenneth Murphy a montré que l'administration du FLT3L aux animaux $Flt3^{-/-}$ ne permettait pas d'améliorer la génération des DCs, ce qui implique que l'hypothèse précédente est fautive (Durai *et al.*, 2018). Cette étude a montré que les progéniteurs des DCs issus des souris $Flt3^{-/-}$ peuvent maturer en réponse au M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). De plus, les souris doubles déficientes $Csf1r^{-/-}Flt3^{-/-}$ présentent un nombre de DCs réduit en comparaison aux souris simples déficientes. Ainsi, d'autres cytokines pourraient participer au développement des DCs en l'absence du récepteur FLT3. De manière paradoxale, la délétion du FLT3 chez les souris $FLT3^{f/f}$ augmente le nombre de DCs à un niveau égal aux souris $Flt3^{-/-}$. Ainsi, la différence observée entre les souris $Flt3^{f/f}$ et $Flt3^{-/-}$ s'explique par une plus forte sensibilité des cellules $Flt3^{-/-}$ aux autres cytokines. L'absence de ce récepteur augmente la signalisation des autres permettant une compensation partielle (Durai *et al.*, 2018).

Le GM-CSF est la seconde cytokine clé dans le développement des DCs et a été mise en évidence d'abord *in vitro*. En effet, cette cytokine est suffisante pour induire la différenciation de précurseurs hématopoïétiques et de monocytes circulants, en cellules de même morphologie, phénotype et fonction que les DCs (Inaba *et al.*, 1992). *In vivo*, les souris déficientes ne présentent pas d'altérations du nombre de cDCs de la rate ni des ganglions. Par contre, le nombre de DCs résidentes dans les tissus non lymphoïdes est fortement diminué (Greter, Helft, *et al.*, 2012). De plus, ces souris ne sont pas aptes à induire la prolifération d'antigènes inoculés dans les poumons (Greter, Helft, *et al.*, 2012). Ainsi, le GM-CSF régule l'homéostasie et la fonction des DC des tissus non lymphoïdes.

3.4. Voies transcriptionnelles de la différenciation des cellules dendritiques

Pour comprendre la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en DCs, les facteurs de transcription impliqués ont été mis en évidence (**Figure 7**). Le facteur PU.1 joue un rôle important dans la différenciation hématopoïétique de manière dose-dépendante. De fortes quantités de ce facteur sont nécessaires pour la différenciation des monocytes et des DCs (Carotta, Wu et Nutt, 2010). Il a été mis en évidence que l'inactivation de ce facteur chez des souris adultes a pour conséquence l'ablation des DCs en seulement quatorze jours (Carotta,

Wu et Nutt, 2010). Son expression est contrôlée par STAT3. Il a été montré qu'il existe une boucle spécifique dans la génération des DCs impliquant la cytokine FLT3L, STAT3 et PU.1 (Merad, 2010). La voie de signalisation de FLT3L active STAT3 qui lui-même induit l'expression de PU.1. En conséquence, PU.1 se lie au promoteur de *Flt3* et régule son expression (Puhr *et al.*, 2015). Cette boucle continue est cruciale pour le développement des DCs. Plus récemment, il a été montré que le facteur de transcription Bcl11 est nécessaire au développement de toutes les populations de DCs en participant également au contrôle de l'expression de *Flt3* (Wu *et al.*, 2013).

Zbtb46 est un facteur de transcription spécifique du progéniteur pré-cDC et est exclu de la voie des pDCs (Satpathy *et al.*, 2012). Ainsi, une expression forcée de *Zbtb46* dans les progéniteurs de la moelle osseuse induit une augmentation du nombre de DCs conventionnelles mais pas des neutrophiles (Satpathy *et al.*, 2012).

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des DCs. PU.1 active la transcription d'IRF8. IRF8 est essentiel pour induire la différenciation du MDP et CDP (Schönheit *et al.*, 2013). En effet, les souris déficientes pour IRF8 présentent un nombre élevé de MDP et un nombre réduit de CDP (Becker *et al.*, 2012). De même, chez l'homme, la mutation du facteur bloque la transition du GMP en MDP et, en conséquence, les monocytes et les DCs ne se différencient pas (Hambleton *et al.*, 2011). IRF8 est également impliqué dans la différenciation des sous-populations avec BATF3. Leur expression dans les progéniteurs pré-cDCs induit la différenciation des cDC1. BATF3 permet de maintenir l'expression d'IRF8 nécessaire à l'induction des cDC1 (Grajales-Reyes *et al.*, 2016) et n'est exprimé que dans cette lignée. Pour la différenciation des cDC1s, il a également été montré que le facteur répresseur Nfil3 est nécessaire (Kashiwada *et al.*, 2011). Chez les souris déficientes pour Nfil3, l'expression de *Batf3* dans les progéniteurs de cDCs est réduite, ce qui suggère que Nfil3 agit en amont de *Batf3*. Un autre facteur est également nécessaire au développement des cDCs CD8⁺ : Id2 (Hacker *et al.*, 2003). Sa surexpression *in vitro* induit un blocage de la différenciation des pDCs et, à l'inverse, les souris déficientes pour Id2 présentent un nombre accru de pDCs. Ainsi, *Irf8*, *Id2* et *Batf3* agissent ensemble dans le développement des cDC1.

A l'inverse, l'absence de BATF3 dans la différenciation des cDC2, a été associée à la perte d'expression d'IRF8. Dans la différenciation de cette sous-population, c'est le facteur de transcription IRF4 qui est nécessaire (Puhr *et al.*, 2015).

En ce qui concerne la différenciation des pDCs, E2-2 est le facteur de transcription principal. Il induit simultanément le développement des pDCs et inhibe la voie de différenciation des cDCs. Ensemble, l'augmentation de l'expression d'E2-2 et la diminution de l'expression d'ID2 sont des déterminants clés de la différenciation des pDCs.

Ainsi, le développement des DCs est induit par de multiples facteurs de transcription et surtout par un effet dose selon le stade de différenciation. La coordination des différents facteurs permet de conserver un même ensemble de facteurs pour établir différents programmes de différenciations et donc différentes lignées à partir de progéniteurs communs.

4. Les sous-populations de cellules dendritiques

Les DCs sont présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, plaque de Peyer et thymus) et dans tous les tissus périphériques tels que les poumons, les muscles, l'intestin. Les DCs peuvent être divisées en deux groupes, les cellules résidentes et les cellules migratoires (Segura, 2016). Les cellules résidentes sont présentes dans les organes lymphoïdes secondaires. A l'inverse, les DCs migratoires sont présentes en périphérie, dans les tissus et dans les organes non-lymphoïdes, et migrent de manière constitutive dans les organes lymphoïdes via la lymphe (Segura, 2016). Dans des conditions normales, les DCs présentent un phénotype immature avec une faible expression des molécules de co-stimulation. Après une activation, les cellules migratoires acquièrent un phénotype mature au cours de leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires, ce dont je parlerai ultérieurement. Les DCs peuvent être divisées en sous-populations (**Figure 8**).

4.1. Les cellules dendritiques conventionnelles

Les cellules dendritiques conventionnelles ou cDCs ont été considérées comme les DCs « lymphoïdes ». En effet, les travaux de Ken Shortman ont mis en évidence que les DCs (CD11c⁺CMH II⁺) se divisent en deux sous-populations retrouvées dans plusieurs organes lymphoïdes. Une population qui exprime le CD11b et le CD4 et l'autre population qui exprime le CD8 α (Vremec *et al.*, 2000). Autrement dit, des marqueurs purement lymphoïdes exprimés par les lymphocytes T. Les cDCs ont une demi-vie courte et sont renouvelées de façon constante dans la moelle osseuse (Liu *et al.*, 2007). Le développement des cDCs

présente une signature transcriptionnelle qui les distingue des pDCs, comme décrit précédemment. Elles sont divisées en deux populations : cDC1 et cDC2.

Les cDC1 aussi appelées DCs Batf3-dépendantes sont constituées des cellules résidentes CD8⁺ (dans les organes lymphoïdes) et des cellules migratoires CD103⁺Langerin⁺ dans les tissus non lymphoïdes, chez la souris (Segura, 2016). Chez l'homme, cette population nommée BDCA3/CD141⁺ DCs est caractérisée par les marqueurs CD141, XCR1, CLEC9A et la molécule d'adhésion CADM1 (Patente *et al.*, 2019). Comme expliqué précédemment, leur développement est dépendant des facteurs de transcription IRF8 et Batf3.

Les cellules cDC2 ou IRF4-dépendantes, sont les DCs CD11b⁺ chez la souris et CD1c⁺ (BDCA-1) chez l'homme. Elles expriment les marqueurs CD11b et SIRPα chez la souris et chez l'homme (Segura, 2016). Selon le tissu dans lequel ces cellules sont localisées, elles peuvent exprimer des marqueurs supplémentaires, par exemple, dans le derme le CD1a et dans l'intestin le CD103 (Segura, 2016; Patente *et al.*, 2019).

Les cDCs ont un rôle majeur dans la présentation des antigènes aux cellules T. Les deux sous-populations sont particulièrement efficaces pour présenter les peptides endogènes associés aux molécules du CMH de classe I pour activer les lymphocytes T CD8⁺ et les peptides exogènes associés aux molécules du CMH de classe II pour activer les lymphocytes T CD4⁺. En effet, en comparaison avec les macrophages, les cDC sont plus aptes à présenter les antigènes et à activer les cellules T. Cette différence s'explique principalement par une activité protéolytique nettement moins forte dans la voie endosomale des cDCs (ainsi que les cellules B) par rapport aux macrophages (Delamarre *et al.*, 2005). Il est important de noter que la quantité et l'activité d'autres types d'hydrolases ne sont pas ou peu différentes entre les DCs et les macrophages, ce qui renforce le concept d'une adaptation précise des DCs dans le traitement des antigènes protéiques (Delamarre *et al.*, 2005). Ainsi, les protéines endocytées sont dégradées plus lentement que dans les macrophages, permettant la génération des peptides antigéniques suffisamment longs pour leur assemblage sur les molécules du CMH. Je reviendrai plus en détails sur ce mécanisme ultérieurement.

Chez la souris, il a été mis en évidence que les cellules cDC1 seraient plus efficaces que les cDC2 pour activer les lymphocytes T CD8⁺ par la voie de cross-présentation (antigènes exogènes présentés sur la molécule du CMH de classe I). En effet, les souris déficientes pour *Batf3*, dans lesquelles les cDC1 sont absentes, sont incapables à présenter des antigènes exogènes aux cellules T CD8⁺ (Hildner *et al.*, 2008). De manière intéressante, la présentation

aux cellules T CD4⁺ n'est pas altérée dans ces souris. Une hypothèse expliquant la spécialisation des DC1 dans la cross-présentation serait leur plus forte capacité à internaliser les cellules en apoptose. En effet, bien que les DC1 et les DC2 internalisent les antigènes solubles de manière similaire (Pooley *et al.*, 2001), il a été montré que les DC1 sont plus aptes à internaliser des cellules en apoptose (Schulz et Reis e Sousa, 2002). Ainsi, la spécialisation des DC1 pourrait s'expliquer par la présence de récepteurs particuliers permettant la captation des cellules en apoptose, comme il a été montré pour le récepteur Clec9A (Sancho *et al.*, 2009). Plus récemment, une différence en terme de pH a également été proposée. En effet, il est connu que le pH des phagosomes est finement régulé pour permettre la dégradation des antigènes en peptides (Savina *et al.*, 2006). Une étude a mis en évidence que le pH des phagosomes des DC1 est plus alcalin que celui des DC2 (Savina *et al.*, 2009). Ainsi un pH plus alcalin et une dégradation moins importante pourraient permettre une sortie des antigènes vers le cytosol. Le mécanisme de cross-présentation nécessite la protéine IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) pour le clivage des peptides à une taille optimale pour le chargement sur la molécule du CMH de classe I. Pour expliquer la spécialisation des DC1 dans la cross-présentation, il a également été proposé que ces cellules recruteraient de manière plus importante la protéine IRAP (Weimershaus *et al.*, 2012). De plus, cette étude suggère que le recrutement des endosomes IRAP⁺/Rab14⁺ contribuerait à une efficacité plus importante des DC1 dans la cross-présentation.

Il a pu être récemment démontré que ce processus est important dans la réponse anti-tumorale. D'une part, une étude du groupe de Sebastian Amigorena a mis en évidence que la délétion spécifique de Sec22b dans les DCs permettait de réduire spécifiquement la cross-présentation (sans affecter le développement et les autres fonctions de ces cellules) et était associée à une réponse T CD8⁺ anti-tumorale altérée (Alloatti *et al.*, 2017). D'autre part, le groupe de Kenneth Murphy est arrivé à des conclusions similaires sur le rôle crucial de la cross-présentation dans divers contextes immunitaires à travers le ciblage du gène *Wdfy4* (Theisen *et al.*, 2018). Ces études sont particulièrement intéressantes parce qu'elles utilisent des modèles dans lesquels seul le processus de cross-présentation semble altéré, au contraire d'un défaut global de présentation à toutes les cellules T ou d'un défaut des fonctions innées (cytokines).

Chez l'homme, cette spécialisation des cDC1 est moins vraie. Une étude a mis en évidence que les cDC1 humaines étaient les plus efficaces pour la cross-présentation (Jongbloed *et al.*,

2010). Néanmoins, ces résultats ont été obtenus en stimulant les cDC1 et les cDC2 du sang avec du Poly:IC qui active le TLR3 (toll-like receptor) alors que seules les cDC1 expriment ce TLR. Lorsque les deux sous-populations sont activées à un niveau égal, elles sont capables de réaliser la cross-présentation (Segura, Durand et Amigorena, 2013). De plus, contrairement aux pDCs murines, les pDCs humaines sont capables de cross-présenter les antigènes. En ce qui concerne les DCs tissulaires, plus difficile à étudier, seules les DCs de la peau ont été bien caractérisées. Les cellules de Langerhans et les cellules CD1a⁺ seraient capables de cross-présenter les antigènes alors que les cellules CD14⁺ seraient beaucoup moins aptes (Segura, Durand et Amigorena, 2013).

Les DCs ont également un rôle majeur en sécrétant des cytokines et en polarisant la réponse T. Il a été montré que les cDC1 orientent la réponse immunitaire vers le développement des Th1 grâce à leur capacité de sécrétion de l'IL-12p70. A l'inverse, il a été suggéré que les cDC2 seraient plus impliquées dans l'induction des réponses Th2 et Th17 (Maldonado Lopez *et al.*, 1999; Pulendran *et al.*, 1999).

4.2. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDCs, doivent leur nom à leur ressemblance morphologique avec des plasmocytes. A l'origine, elles étaient appelées « cellules productrices d'interféron (IFN) » du fait de leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I après activation.

A l'inverse des cDCs, les pDCs expriment des marqueurs différents entre la souris et l'homme. Chez la souris, elles sont caractérisées par l'expression de CD11c^{int}CD11b⁻B220⁺SiglecH⁺CD317⁺ (Nakano, Yanagita et Gunn, 2001). Chez l'homme, les pDCs n'expriment pas le CD11c mais expriment les marqueurs CD123, CD303 (BDCA2), CD304 (BDCA4) (Patente *et al.*, 2019). Le facteur transcriptionnel majeur dans la différenciation des pDCs est E2-2.

Ces cellules sont présentes en très faible nombre, moins de 0,4% des cellules mononuclées du sang, mais ont une très grande capacité à produire les IFN de type 1, dont les principaux sont l'IFN α et l'IFN β . En sécrétant ces cytokines, les pDCs activent les cellules NK et stimulent leur activité cytotoxique (Colonna, Trinchieri et Liu, 2004). Elles sont également capables d'induire la différenciation des cellules B en cellules plasmiques productrices d'immunoglobulines. Elles sont activées par les TLR7 et 9 et ont ainsi un rôle crucial dans la réponse antivirale (Colonna, Trinchieri et Liu, 2004).

Contrairement aux pDCs chez la souris, chez l'homme, ces cellules sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T et d'induire une réponse Th1 ou Treg selon les signaux d'activation et l'environnement (Segura, 2016).

4.3. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont les premières DCs identifiées. Elles sont localisées dans l'épiderme de la peau et dans les muqueuses buccales et vaginales. Leur développement diffère des autres DCs migratoires. Leur différenciation est dépendante du M-CSFR (CD115) dont les ligands sont l'IL-34 dans des conditions normales et le M-CSF lors d'une inflammation (Greter, Lelios, *et al.*, 2012).

Ces cellules sont capables de migrer dans les organes lymphoïdes pour présenter les antigènes et activer les lymphocytes T. Ce sont donc des cellules très importantes dans les infections cutanées. Par exemple, dans l'infection à *Candida albicans*, les cellules de Langerhans induisent la réponse Th17 (Segura, 2016).

4.4. Cellules dendritiques inflammatoires

Durant une inflammation, les monocytes recrutés sur le site peuvent se différencier en cellules exprimant des marqueurs de DCs tels que le CD11c et le CMH II et ayant des capacités de migration dans les organes lymphoïdes et de présentation antigénique. Ces cellules ont été appelées cellules dendritiques inflammatoires (Segura et Amigorena, 2013). Leur développement est dépendant du récepteur au M-CSF. Ces cellules ne dérivant pas du progéniteur commun aux DCs, elles ont été classées dans une lignée différente des cDC et des pDC. Ces DCs inflammatoires sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T CD4⁺, d'induire les réponses Th1, Th2 et Th17, selon l'environnement inflammatoire et de cross-présenter les antigènes aux T CD8⁺ (Segura et Amigorena, 2013).

4.5. Les cellules dendritiques dérivées *in vitro*

La majorité des connaissances sur les DCs humaines a été possible grâce aux techniques de différenciation *in vitro* des cellules à partir de progéniteurs CD34⁺ ou de monocytes circulants. Les monocytes sont cultivés avec du GM-CSF et de l'IL-4 et nommés mo-DC (monocytes derived dendritic cells) (Sallusto *et al.*, 1994). En 2015, une étude a mis en

évidence que les mo-DC étaient plus proches des DCs inflammatoires que des autres sous-populations (Reynolds et Haniffa, 2015).

Chez la souris, les DCs sont dérivées de la moelle osseuse en présence de GM-CSF et nommées BMDC (bone-marrow derived dendritic cells) (Inaba, 1992). Il a été mis en évidence que les BMDC sont une population hétérogène de cellules exprimant le CD11c et le CMH de classe II. En effet, les cellules CD11c⁺CMH II^{int} semblent être plus proches des macrophages alors que les cellules CD11c⁺CMH II^{hi} ressemblent aux cDCs (Helft *et al.*, 2015). Cette observation est importante à prendre en compte lors de l'attribution d'un phénotype. Par exemple, la vaste majorité de l'IL-6 ou de l'IL-1β produits suite à une stimulation par le LPS ou LPS + ATP de ces cellules, respectivement, provient de la sous-population macrophagique alors que la sous-population de DCs est largement la plus efficace pour stimuler des cellules T naïves à partir d'un antigène exogène (Helft *et al.*, 2015).

Bien que ces cellules dérivées *in vitro* aient amélioré les connaissances sur les DCs, il est important de se poser la question de leur pertinence biologique selon les fonctions étudiées et l'extrapolation des résultats aux DCs *in vivo*.

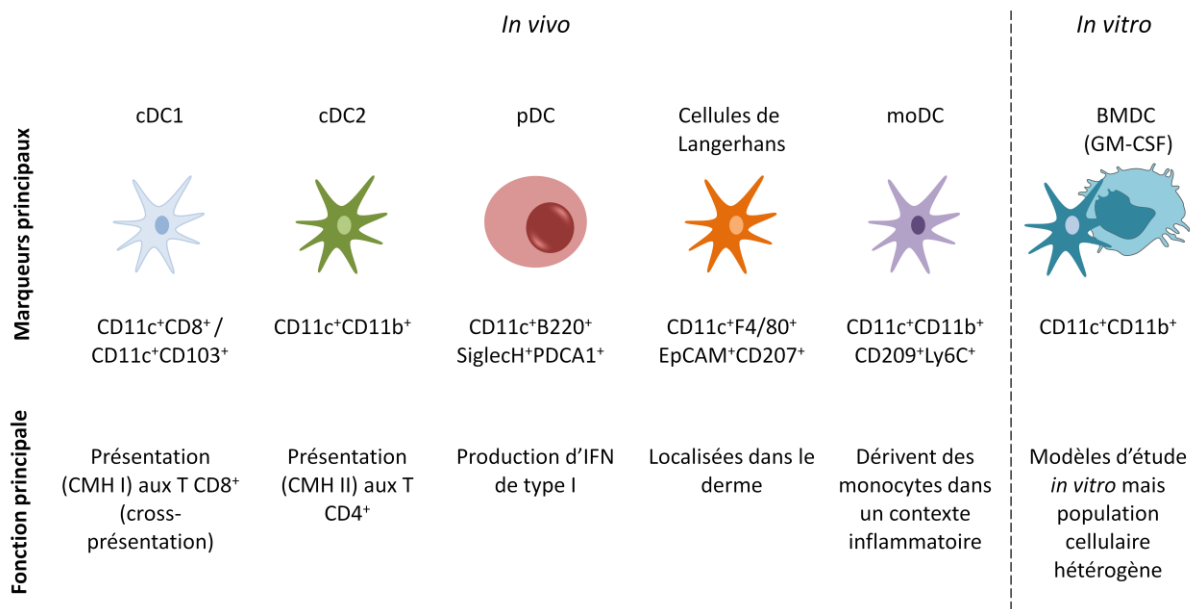


Figure 8 Représentation simplifiée des différentes sous-populations de DCs, leurs principaux marqueurs et leur principale fonction chez la souris.

5. Historique de la présentation antigénique

Avant de décrire les mécanismes de la présentation antigénique, il est intéressant de se demander comment les principes du CMH et de la présentation des antigènes ont émergé.

Au début des années 1900, Ernest Tyzzer et Clarence Little ont réalisé des modèles de transplantation de tumeurs chez des souris. Ces animaux étaient issus du croisement de souris susceptibles et de souris résistantes à la tumeur allogénique. Ils ont mis en évidence que la susceptibilité de la pousse tumorale était dépendante de facteurs génétiques (Thorsby, 2009). Néanmoins, ces facteurs de susceptibilité n'étaient alors pas connus. Par la suite, le chercheur anglais Peter Gorer a étudié si cette susceptibilité tumorale pouvait être associée aux antigènes du groupe sanguin. Il a montré que son propre sérum contenait des anticorps différents de ceux de trois souches de souris (Gorer, 1936). En immunisant des lapins avec les érythrocytes des trois souches de souris, il a réussi à mettre en évidence trois antigènes selon leur expression chez les souris : antigène I, II et III. Il a également observé que l'antigène II serait un facteur important dans le rejet de la tumeur quand il est présent chez le donneur et absent chez le receveur. En parallèle, le chercheur américain George Snell travaillait sur les gènes de résistance aux tumeurs qu'il a nommés les gènes de l'histocompatibilité ou les gènes *H*. Il a mis en évidence que les souris porteuses du gène *Fu* (gène induisant une déformation de la queue et permettant ainsi la reconnaissance des animaux) sont résistantes aux tumeurs provenant des souris exprimant l'antigène II (la souche A). Ensemble, Peter Gorer et Georges Snell ont montré que l'antisérum contre les antigènes II (c'est à dire le sérum issu des lapins immunisés avec l'antigène II et ayant développé des anticorps contre cet antigène) ne réagit pas contre les érythrocytes des souris possédant le gène *Fu*. Ainsi, ils ont mis en évidence que l'antigène II était codé par un gène sur le locus H de la souche A et que les souris *Fu* possédaient sur le même locus un allèle différent. Ce locus a été nommé *histocompatibilité locus 2* ou *H-2*. Ce travail a été poursuivi par l'équipe de Georges Snell qui a mis en évidence que les gènes murins du locus H-2 induisent un rejet rapide en comparaison à d'autres locus. C'est ainsi que le locus *H-2* a été nommé Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (Thorsby, 2009).

Chez l'homme, ce sont les travaux de trois équipes parus en 1958 qui ont conduit à l'identification du HLA : Jean Dausset, Jon van Rood et Rose Payne. Leurs trois publications ont mis en évidence que le sérum de patients ayant reçu plusieurs transfusions sanguines ou

de femmes ayant eu plusieurs grossesses, réagit avec les leucocytes de plusieurs mais pas de toutes les personnes testées. Jean Dausset et son équipe réalisaient des tests systématiques d'agglutination des antigènes présents dans le sérum de patients transfusés plusieurs fois, contre les leucocytes de volontaires. Ils ont observés que, dans certains cas, le test d'agglutination était positif, dans d'autres, il était négatif. Ils ont remarqué que les leucocytes provenant de trois panels de donneurs étaient moins agglutinés, comme si dans ces trois sérums il manquait un antigène présent fréquemment dans la population. Cet antigène a été nommé MAC, des initiales des trois donneurs volontaires. La population a alors été séparée en deux groupes : ceux présentant les anticorps anti-MAC et les autres n'en ayant pas. Le dernier argument prouvant leur hypothèse est que, parmi les patients transfusés avec du sang MAC-positif, seuls les patients qui étaient MAC-négatifs développaient des anticorps anti-MAC (Dausset 1958). Par la suite, cet antigène MAC a été nommé HLA-A2 (human leuocyte antigen). De manière très intéressante, Jean Dausset termine son article en suggérant que l'étude des antigènes des leucocytes pourrait devenir d'une grande importance dans la transplantation d'organes et de moelle osseuse. De nombreux travaux ont été nécessaires pour comprendre la complexité du HLA et les conséquences en transplantation, notamment.

La seconde avancée majeure dans la compréhension de la présentation des antigènes est la mise en évidence de la restriction des lymphocytes T par les molécules du CMH, c'est-à-dire, une avancée majeure vers l'élucidation de la fonction des molécules du CMH. Cette découverte a été réalisée en 1974, par Rolph Zinkernagel et Peter Doherty. Les auteurs ont immunisé des souris de différentes souches (CBA/H, C57BL/6, BALB/c) avec le virus LCMV (lymphocytic chorimeningitis virus), puis, après quelques jours, ont isolé les cellules de la rate contenant les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du virus. Les différentes lignées de souris possèdent un haplotype différent. Ils ont réalisé un test de cytotoxicité en incubant ces cellules spléniques avec des cellules infectées (lignée cellulaire murine L929) du même haplotype que les souris CBA/H et ont mesurés la cytotoxicité par la libération de chrome radioactif par les cellules lysées. Les résultats montrent que les CTLs ne sont capables de lyser que les cellules syngéniques infectées. Autrement dit, les lymphocytes T et les cellules cibles doivent partager les mêmes molécules du CMH pour qu'une réponse immunitaire se développe. Ainsi la reconnaissance antigénique des lymphocytes T CD8⁺ est restreinte au CMH (Zinkernagel et Doherty, 1974).

Une autre découverte clé dans l'activation des lymphocytes T est l'apprêtement de l'antigène. Kirk Ziegler et Emil Unanue ont mis en évidence en 1981 que les protéines internalisées doivent être apprêtées avant d'être présentées à la membrane des cellules présentatrices (Ziegler et Unanue, 1981). Il a été montré que les lymphocytes T ne peuvent pas lier les antigènes sous leur forme native mais qu'ils peuvent les lier lorsqu'ils sont présentés par les macrophages. Les macrophages sont capables d'internaliser en cinq minutes des bactéries telles que *Listeria monocytogenes*. Par contre, les cellules T ne peuvent se lier aux macrophages qu'après une période de trente à soixante minutes après l'internalisation de la bactérie. De plus, les auteurs ont montré que des macrophages fixés au paraformaldéhyde immédiatement après l'internalisation de la bactérie ne sont pas capables d'induire une liaison avec les lymphocytes T. A l'inverse, les macrophages fixés après une période de soixante minutes sont capables de lier les lymphocytes T. Ainsi, des processus intracellulaires d'apprêtement des antigènes sont nécessaires pour que les cellules T reconnaissent et se lient aux peptides présentés par les APCs (Ziegler et Unanue, 1981).

Les recherches au cours des deux décennies qui suivront, détailleront les processus cellulaires depuis la dégradation partielle des protéines en peptides jusqu'à leur chargement sur les molécules de CMH et la présentation, à la surface de ces complexes, aux cellules T ayant le potentiel de les reconnaître par leurs récepteurs T (TCR). Les présentations antigéniques par le CMH de classe I aux lymphocytes CD8⁺ ou celle par le CMH de classe II aux cellules CD4⁺ impliquent des mécanismes différents et représentent des événements essentiels dans la mise en place d'une réponse immune.

6. Présentation des antigènes par la voie du CMH de classe I

6.1. Généralités

Dans la physiologie normale d'une cellule, les protéines sont constamment dégradées et remplacées par des protéines nouvellement synthétisées. L'un des processus de dégradation est la voie ubiquitine-protéasome. Cette voie concerne les protéines cytosoliques, c'est-à-dire des protéines propres à la cellule, par exemple, les protéines de régulation qui sont rapidement dégradées après avoir rempli leur fonction, les protéines altérées ou dont le repliement est incorrect. Il a également été mis en évidence que 30 à 70% des protéines synthétisées sont dégradées immédiatement. Ces protéines sont nommées DRiPs (defective

ribosomal products) et sont le résultat d'une mauvaise transcription ou traduction, d'un mauvais cadre de lecture ou d'un mauvais assemblage dans un complexe protéique plus important, par exemple (Neefjies *et al.*, 2012; Yewdell, Schubert et Bennink., 2001). Ces DRiPs sont très rapidement dégradés pour éviter la formation d'agrégats qui seraient délétères pour la cellule. Il a été suggéré que les DRiPs constituent la source majeure de peptides pour la présentation endogène par la voie du CMH de classe I. Néanmoins, il a également été suggéré que ces peptides seraient issus non pas de protéines altérées mais de protéines nouvellement synthétisées et non défectueuses (Rock *et al.*, 2014). Cette voie de dégradation concerne également les protéines mutées, impliquées dans les cancers, et les protéines virales, produites dans les cellules infectées. Ces protéines sont dégradées dans le protéasome puis liées aux molécules du CMH de classe I. Les cellules présentent à leur surface ces complexes CMH I-peptide et activent les lymphocytes T CD8⁺. Les peptides du Soi ne seront pas reconnus par les CTL (élimination des lymphocytes auto-réactifs lors de la sélection négative dans le thymus). Par contre, les peptides issus de protéines mutées ou infectées seront reconnus par les CTL et permettront l'initiation des réponses immunes anti-tumorales et antivirales.

6.2. La molécule du CMH de classe I

La molécule du CMH de classe I est exprimée par presque toutes les cellules nucléées mais à des niveaux d'expression différents. La molécule du CMH de classe I est composée d'une chaîne lourde α associée à la chaîne légère β_2 -microglobuline. La chaîne α est organisée en trois domaines externes (α_1 , α_2 et α_3), un domaine transmembranaire hydrophobe et un segment d'ancrage cytoplasmique. La chaîne β_2 -microglobuline ne contient pas de domaine transmembranaire et est liée à la chaîne α de façon non covalente. La poche de liaison au peptide est localisée sur la face supérieure de la molécule du CMH de classe I et permet la fixation d'un peptide de huit à dix acides aminés. Les chaînes α et β_2 -microglobuline sont synthétisées puis assemblées dans le réticulum endoplasmique, où elles sont stockées en attendant qu'elles soient liées à un peptide et envoyées à la membrane plasmique pour présenter l'antigène.

6.3. Dégradation des antigènes cytosoliques dans le protéasome

Les peptides qui sont présentés associés à la molécule du CMH de classe I sont en général des peptides issus de protéines cytosoliques. Ces protéines sont dégradées par la voie ubiquitine-protéasome (**Figure 9**).

Les protéines qui seront dégradées sont marquées par l'ajout de l'ubiquitine, une protéine de soixante-seize acides aminés liée de façon covalente à un groupement amine libre. Cette ubiquitination fait appel à plusieurs enzymes, une enzyme activant l'ubiquitine de manière ATP-dépendante (E1), une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2), une enzyme nommée ubiquitine-ligase qui permet la ligation de l'ubiquitine à un substrat (E3) et, dans certains cas, une quatrième enzyme dont la fonction est moins bien connue (E4). Les protéines conjuguées à l'ubiquitine seront dirigées vers le protéasome pour être dégradées.

Le protéasome est un complexe protéasique multimérique localisé dans le cytosol et dans le noyau (Leone *et al.*, 2013). Il s'agit d'une structure cylindrique composée d'une partie centrale catalytique nommée 20S et d'éléments régulateurs nommés 19S. L'ensemble est appelé protéasome 26S. Trois sous-unités du protéasome peuvent être remplacées par des sous-unités équivalentes mais de masse moléculaire plus faible : LMP2, LMP7 et LMP10. Le protéasome formé de ces trois sous-unités est nommé immunoprotéasome. Il est induit dans des conditions de réponse immunitaire forte et notamment par les IFN de type I et de type II. Il a été montré qu'à l'état immature, les DCs possèdent autant de protéasome que d'immunoprotéasome, alors qu'à l'état mature, elles n'ont que l'immunoprotéasome (Macagno *et al.*, 1999). De manière intéressante, il a été mis en évidence que cet immunoprotéasome est exprimé dans les APCs du thymus (DCs, macrophages et cellules épithéliales) et joue donc un rôle dans la sélection des lymphocytes (Melnikova *et al.*, 2010). Les protéines liées à l'ubiquitine vont entrer dans le protéasome ou l'immunoprotéasome où elles seront dégradées en peptides de deux à vingt-cinq acides aminés qui seront ensuite relargués dans le cytosol.

De nombreuses études ont mis en évidence que l'absence d'un élément de la voie d'apprêtement des antigènes liés au CMH de classe I a des effets délétères. Par exemple, la diminution d'expression des sous-unités du protéasome a été mise en évidence dans de nombreux cancers, par exemple dans les cancers colorectaux (Kloor *et al.*, 2005) ou les

carcinomes ovariens (Leffers *et al.*, 2009). C'est également le cas pour les sous-unités LMP2, LMP7 ou LMP10 spécifiques de l'immunoprotéasome.

6.4. Transport des peptides du cytosol au réticulum endoplasmique

Les peptides issus du protéasome sont relargués dans le cytosol puis transportés dans le réticulum endoplasmique dans lequel la chaîne du CMH de classe I est présente (**Figure 9**). Les peptides sont transportés dans le réticulum endoplasmique grâce au transporteur TAP (transporteur associated with antigen presentation). Ce complexe est constitué de deux demi-transporteurs associés, TAP1 et TAP2. Ces molécules contiennent un domaine transmembranaire hydrophobique et un domaine de liaison aux nucléotides cytosoliques. TAP forme un pore à travers la membrane du réticulum endoplasmique dont l'activation est dépendante de l'ATP (Arora, Lapinski et Raghavan, 2001; Schmitt et Tampé, 2002). Ce transporteur TAP a une plus forte affinité pour les peptides de huit à seize acides aminés ; le transport de peptide plus grand est moins efficace. Néanmoins, comme je l'ai expliqué précédemment la poche de liaison au peptide de la molécule du CMH de classe I permet la liaison de peptides de huit à dix acides aminés. Les peptides plus longs qui rentrent dans le réticulum endoplasmique doivent être à nouveau dégradés pour pouvoir se lier au CMH de classe I. Cette dégradation est assurée par la protéine ERAP (endoplasmic-reticulum amino-peptidase) (Chang *et al.*, 2005). ERAP dégrade les peptides afin que leur taille soit comprise entre huit et neuf acides aminés (Chang *et al.*, 2005). D'autres peptidases ont également été impliquées dans le réticulum endoplasmique, par exemple ACE (angiotensin converting enzyme) et SP (signal peptidase) (Lazaro *et al.*, 2015). Le transporteur TAP est également plus affiné pour les peptides présentant des acides aminés carboxy-terminaux hydrophobes ou basiques qui sont les résidus d'ancrage préférentiels dans la molécule du CMH de classe I. Chez l'homme, le syndrome des lymphocytes nus (bare lymphocyte syndrome ou BLS) est un sévère déficit des molécules HLA de classe I (BLS1) ou des molécules HLA de classe II (BLSII). Ces syndromes dont les causes sont différentes sont à l'origine de nombreuses infections récurrentes et chroniques. Le seul traitement curatif à l'heure actuelle est la greffe de moelle osseuse. Parmi les personnes atteintes de BLS1, chez dix patients, il a été diagnostiqué une déficience du complexe TAP à l'origine de la diminution de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules (Gadola *et al.*, 2000).

6.5. Liaison des peptides à la molécule du CMH de classe I

Les peptides transportés dans le réticulum sont chargés sur les molécules du CMH de classe I grâce à quatre protéines chaperonnes : la calnexine, ERP57, la calréticuline et la tapasine. La chaîne α nouvellement synthétisée est stabilisée par la calnexine et ERP57 (**Figure 9**). Lorsque la β_2 -microglobuline se lie à la chaîne α , la calnexine est libérée et le complexe se lie à la calréticuline et à la tapasine (TAP-associated protein). La tapasine a un rôle primordial dans la liaison du peptide en recrutant le complexe CMH I/protéines chaperonnes à proximité du transporteur TAP. Le complexe formé du transporteur TAP, de la tapasine, de la molécule du CMH de classe I, de la calréticuline et d'ERP57 forme le PLC (peptide-loading complex) (Sadasivan *et al.*, 1996). Le PLC permet le chargement d'un peptide de taille appropriée sur la molécule du CMH de classe I. De manière intéressante, l'équipe de Peter Cresswell a montré que dans une lignée déficiente pour la protéine tapasine, le complexe CMH I-TAP est inexistant et le chargement du peptide est altéré (Sadasivan *et al.*, 1996). Lorsque le chargement du peptide est efficace, les protéines chaperonnes se détachent du PLC et la molécule du CMH de la classe I quitte le réticulum endoplasmique dans des vésicules qui traversent l'appareil de Golgi et migrent jusqu'à la membrane plasmique. La vésicule fusionne avec la membrane plasmique ce qui permet à la molécule du CMH de classe I d'être exposée à la surface de la cellule.

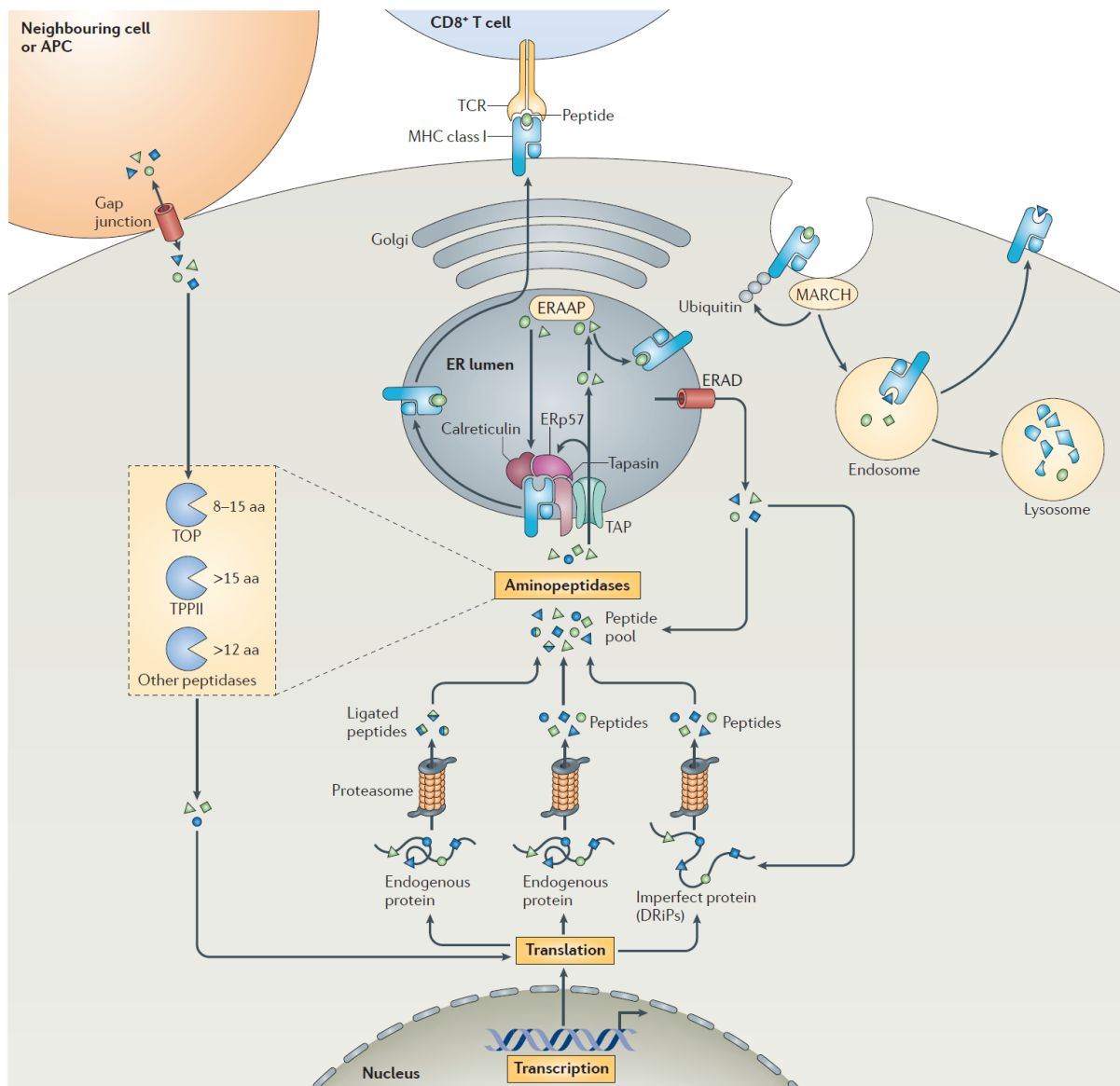


Figure 9 Représentation schématique de la présentation des antigènes endogènes par la voie du CMH de classe I. Les antigènes sont dégradés dans le protéasome puis transportés dans le réticulum endoplasmique où ils sont chargés sur la molécule du CMH de classe I. Les complexes CMHI-peptide sont ensuite envoyés à la membrane plasmique pour activer les lymphocytes T CD8⁺ (de Neeffjes et al., *Nature Immunology* 2011).

7. Présentation des antigènes par la voie du CMH de classe II

7.1. Biosynthèse des molécules du CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II ou HLA-DR chez l'homme, ne sont exprimées que par les cellules présentatrices de l'antigène, dites professionnelles, c'est-à-dire principalement les DCs, les macrophages, les lymphocytes B et les cellules épithéliales thymiques (Roche *et al.*, 2015). L'expression génique des molécules du CMH de classe II et des molécules de la machinerie du classe II telles que la chaîne invariante (ou CD74), HLA-DM (H2-M chez la

souris) et HLA-DO (H2-O chez la souris) sont régulées par le CIITA (MHC class II transactivator) (Reith, LeibundGut-Landmann et Waldburger, 2005). Par exemple, les DCs augmentent l'expression du CMH de classe II en réponse à une stimulation puis, dans les vingt-quatre heures après l'activation, la synthèse de la molécule du CMH de classe II est inhibée (Reith, LeibundGut-Landmann et Waldburger, 2005). Cette régulation est contrôlée par le CIITA dont l'expression est elle-même régulée. Chez l'homme, l'absence du CIITA constitue une catégorie des syndromes des lymphocytes nus (BSL II) dans laquelle les cellules n'expriment pas les molécules du CMH de classe II. Cette pathologie est caractérisée par une réduction de la sélection positive des T CD4⁺ dans le thymus et par l'incapacité de ces cellules à répondre aux antigènes en périphérie. Les patients atteints de ce syndrome souffrent d'infections sévères et récurrentes, touchant le tractus gastro-intestinal, les poumons, les voies respiratoires et urinaires, ayant pour conséquences une mauvaise absorption des aliments, un retard de croissance et pouvant conduire au décès dans la petite enfance. Comme pour les BSL de type I, le seul traitement actuellement est la greffe de moelle osseuse (Reith, LeibundGut-Landmann et Waldburger, 2005).

La molécule du CMH de classe II est constituée de deux chaînes polypeptidiques, une chaîne α et une chaîne β s'associant de manière non covalente. Les deux chaînes présentent deux domaines externes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$), un segment transmembranaire et un segment d'ancrage cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ constituent la poche de liaison au peptide. Ce peptide a généralement une taille comprise entre treize et dix-huit acides aminés.

7.2. Régulation de la molécule du MCH de classe II au cours de la maturation des cellules dendritiques

Dans les DCs immatures, de grandes quantités de molécules du CMH de classe II sont localisées dans le compartiment MIIC, qui sera expliqué dans la partie suivante. Par contre, lorsque les DCs deviennent matures, la machinerie du CMH de classe II est modifiée. Ainsi, la majorité des molécules est localisée à la membrane plasmique afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T (Roche *et al.*, 2015). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette modification de localisation. Dans les cellules immatures, la majorité des molécules est retenue dans le compartiment MIIC pour le chargement du peptide ou est dégradée dans les lysosomes avec un passage à la surface limité dans le temps. A l'inverse, suite à une activation, comme par exemple l'engagement du CD40 par le CD40L (induit sur les cellules T

activées), les molécules sont envoyées à la membrane et la stabilité complexe CMH-peptide est augmentée (Boes *et al.*, 2002). Ainsi, les DCs, y compris à l'état immature, présentent en permanence les antigènes environnants. La forte capacité des DCs à renouveler (« turnover ») leurs complexes CMH II-peptide à la surface a été proposée comme le paramètre définissant le mieux leur état de maturité, au contraire du niveau de génération ou d'accumulation des complexes à la surface (Wilson, El-Sukhari, Villadangos, 2004). Notamment, les cDCs montrent un niveau de renouvellement très important en comparaison à des DCs générées *in vitro* alors que l'expression du CMH de classe II à la surface est très élevée (Villadangos *et al.*, 2001). Autrement dit, une expression relativement forte du CMH de classe II ne signifie pas obligatoirement une maturation élevée d'une DC et peut, au contraire, être associée à un état d'immaturité et une présentation très rapide (renouvellement à la surface) de nombreux complexes CMH II-peptide appelés à être « scannés » par les lymphocytes T CD4⁺. Bien que contre-intuitif en cas de mesure statique du CMH de classe II, ce processus prend tout son sens pour comprendre que le système immunitaire, par l'intermédiaire des DCs en première ligne, est capable d'une surveillance très active et efficace des changements pathologiques dans l'organisme, comme des infections ou l'apparition de néo-antigènes tumoraux. A la suite d'un signal de maturation, la DC va profondément modifier sa biologie intracellulaire sur plusieurs niveaux pour favoriser une présentation plus longue et forte d'une quantité restreinte d'antigènes. Les mécanismes intracellulaires régissant cette accumulation à la surface sont complexes et combinent la régulation progressive à la fois d'un transport accru du MIIC à la surface et d'une diminution de l'internalisation, de la dégradation et de la génération de nouvelles molécules de CMH de classe II.

7.3. Le compartiment d'apprêtement des antigènes : MIIC

Dans les années 1970 - 1980, les chercheurs se sont beaucoup intéressés à comprendre les voies d'apprêtement des antigènes du CMH de classe I et II. Il a été mis en évidence que des agents bloquant les lysosomes n'altèrent pas la présentation du CMH de classe I (Morrison *et al.*, 1986). A l'inverse, des agents perturbant la sortie des molécules du réticulum endoplasmique bloquent la présentation par le CMH de classe I (Nuchtern *et al.*, 1989). Ainsi, il a été mis en évidence que le réticulum endoplasmique est le lieu d'assemblage des molécules du CMH de classe I et des peptides, comme je l'ai décrit précédemment. A

l'inverse, il a été mis en évidence que la présentation par la voie du CMH de classe II est sensible à des agents altérant les lysosomes, ce qui suggérait à l'époque que les peptides exogènes provenant des endosomes étaient présentés par le CMH de classe II. Les travaux en microscopie électronique de Jacques Neefjes en 1990 ont mis en évidence que les molécules du CMH de classe II sont fortement concentrées dans des structures vésiculaires intracellulaires. De plus, ce compartiment est distinct du réticulum endoplasmique, du *trans*-Golgi et des lysosomes (Neefjes *et al.*, 1990). Ce compartiment de la voie endo-lysosomale spécialisée dans l'apprêtement des molécules du CMH de classe II a été nommé MIIC. L'équipe de Hans Geuze, a montré que les peptides exogènes parvenaient à ce compartiment en traversant la voie endosomale. Ainsi, le compartiment MIIC se situe à l'interface entre les endosomes tardifs et les lysosomes (Peters *et al.*, 1991). Il est difficile de caractériser précisément les différents types de vésicules constituant la voie du MIIC, des endosomes aux lysosomes. En effet, le MIIC exprime des marqueurs des lysosomes tels que les protéines LAMPs et des hydrolases (cathepsines). Néanmoins, le compartiment MIIC semble se distinguer des lysosomes par la forte concentration des molécules de la voie de présentation du CMH de classe II (CMH II, DM et DO) (Geuze, 1998) et par un pH moins acide, permettant la dégradation des antigènes en peptides et leur chargement sur la molécule du CMH de classe II.

Des études plus récentes se sont intéressées à la structure de ces endosomes particuliers. Il a été mis en évidence que ce compartiment MIIC est multivésiculaire. Il a été nommé MVB (multiple vesicular bodies). Puis, il a été montré que les molécules participant au chargement du peptide sur la molécule du CMH de classe II sont situées principalement dans des structures internes du MIIC ou ILVs (intraluminal vesicles) (**Figure 10**). Ces résultats ont été confirmés par des expériences de FRET (fluorescence resonance energy transfert) qui ont montré que les molécules HLA-DR et HLA-DM interagissent dans des vésicules internes au MIIC et non pas dans la membrane externe du compartiment (Zwart *et al.*, 2005). Ainsi, pour atteindre ces vésicules internes, les molécules doivent être liées à l'ubiquitine et utiliser la voie de transport endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) (Raiborg et Stenmark, 2009).

Néanmoins, les mécanismes précis d'entrée des molécules du CMH II dans ce compartiment MIIC n'ont pas encore été mis en évidence.

7.4. Liaison de molécule de CMH de classe II à la chaîne invariante

La molécule du CMH de classe II est assemblée dans le réticulum endoplasmique. Pour prévenir un chargement prématuré avec un peptide endogène, la molécule du CMH II est associée à la chaîne invariante (Ii ou CD74) (Teyton *et al.*, 1990). Il a été montré qu'en l'absence de la chaîne invariante dans des cellules Hela (transfectées ou non avec la chaîne invariante), le chargement du peptide est inefficace (Busch *et al.*, 1996). La chaîne invariante se lie au niveau du sillon du peptide de la molécule du CMH de classe II grâce au domaine nommé CLIP (class-II-associated invariant chain peptide) (Riberdy *et al.*, 1992). L'équipe de Peter Cresswell a isolé les peptides liés aux molécules du CMH de classe II par chromatographie. Il a été mis en évidence un peptide présent en grande quantité provenant d'une petite région de la chaîne invariante, c'est-à-dire le peptide CLIP (Riberdy *et al.*, 1992). A la suite de ces résultats, cette équipe a suggéré l'hypothèse que le peptide CLIP pourrait être un fragment de la chaîne invariante qui resterait après la dégradation par protéolyse de la chaîne invariante. Puis le remplacement de ce peptide CLIP par un peptide exogène serait un mécanisme normal dans la voie de présentation du CMH de classe II (Riberdy *et al.*, 1992). La synthèse de la chaîne invariante est en excès par rapport aux molécules du CMH de classe II afin d'assurer en permanence la protection du site de liaison de l'antigène (Roche *et al.*, 2015).

La chaîne invariante a également un rôle de chaperonne en participant au transport des molécules du CMH de classe II à travers l'appareil de Golgi, puis le *trans*-Golgi network jusqu'aux endosomes. Deux voies de transport jusqu'aux endosomes ont été décrites : directement du *trans*-Golgi network aux endosomes (Benaroch et Yilla, 1995; Neefjes *et al.*, 1990), ou bien en passant par la membrane plasmique (Bremnes *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 1993). La chaîne invariante contient deux motifs di-leucine permettant l'adressage de la molécule du CMH de classe II vers les endosomes. Ces motifs sont reconnus par deux protéines adaptatrices AP1 et AP2 (Hofmann *et al.*, 1999). AP1 permet le transport direct du *trans*-Golgi vers le compartiment MIIC pour le chargement des antigènes. La seconde voie qui a été mise en évidence fait intervenir AP2. La protéine permet l'internalisation des complexes CMH II-Ii présents à la membrane plasmique (Roche *et al.*, 1993). Les travaux de l'équipe d'Eric Long ont permis de mettre en évidence que trois mille complexes seraient endocytés par minute (Roche *et al.*, 1993).

Ces deux voies de transport permettent aux molécules du CMH de classe II associées à la chaîne invariante de rejoindre le compartiment MIIC d'apprêtement de l'antigène dans lequel les peptides exogènes sont également présents.

7.5. Internalisation et dégradation des antigènes

Les DCs immatures sont présentes dans l'ensemble des tissus périphériques et des organes lymphoïdes secondaires où elles sondent leur environnement de manière constitutive. Plusieurs mécanismes cellulaires leur permettent d'internaliser du matériel exogène.

L'un de ces mécanismes non spécifiques est la macropinocytose (Lim et Gleeson, 2011). Pour les DCs, il s'agit d'un processus majeur pour la capture des antigènes. Ce mécanisme consiste en l'invagination de la membrane plasmique en enfermant des éléments du milieu extérieur (protéines, bactéries, virus) puis la formation d'une vésicule intracellulaire par complète invagination de la membrane. Ce processus est régulé par l'enzyme GTPase CDC42 (Garrett *et al.*, 2000) et par le remodelage du cytosquelette d'actine dépendant de la protéine RAC (West, 2004). Par exemple, il a été montré que la maturation des BMDC induit la diminution de la macropinocytose en réduisant l'activité de l'enzyme CDC42 (Garrett *et al.*, 2000). A l'inverse, la macropinocytose peut être rétablie par la surexpression de la forme active de l'enzyme (Garrett *et al.*, 2000).

Un autre type d'internalisation des antigènes est l'endocytose médiée par des récepteurs. Les DCs possèdent à leur surface de nombreux récepteurs clathrine-dépendants permettant l'endocytose d'antigènes et facilitant ainsi leur accès au compartiment d'apprêtement. Contrairement à la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante persiste malgré l'activation des DCs (Garrett *et al.*, 2000). Ces cellules expriment également des récepteurs de type lectine comme le mannose récepteur et DEC205 qui leur permettent de reconnaître des résidus carbohydate, à la fois sur les protéines du Soi et sur les pathogènes. L'activation de ces récepteurs de surface permet l'internalisation des protéines directement dans la voie endo-lysosomale pour leur apprêtement et leur présentation (Platt *et al.*, 2010). Ce type d'internalisation permet une activation plus forte des cellules T. Par exemple, l'endocytose par l'activation de DEC205 permet une activation des T mille fois plus forte qu'une internalisation par macropinocytose (Bonifaz *et al.*, 2004).

La phagocytose est l'un des mécanismes les plus importants pour l'internalisation des antigènes étrangers et n'est pas propre aux DCs puisque les macrophages utilisent

également ce processus. Parmi les DCs, toutes les sous-populations ne sont pas aussi efficaces. En effet, les pDCs sont moins aptes que les cellules conventionnelles (Bonifaz *et al.*, 2004). En plus de permettre la présentation d'antigènes étrangers, la phagocytose permet également d'endocyter des cellules du Soi en apoptose. La présentation de ces antigènes du Soi induit une tolérance en périphérie (Steinman, 2000). Comme la macropinocytose, la phagocytose est diminuée après l'activation des DCs. La phagocytose est un mécanisme non spécifique mais qui peut également être induit par des récepteurs, par exemple des récepteurs C-type-Lectins (CLR), des récepteurs Fc (captation des complexes immuns) ou le CD36 qui reconnaissent leur ligand sur des pathogènes ou des cellules en apoptose. Beaucoup de ces récepteurs internalisent leur ligand de manière clathrine-dépendante et sont capables d'endocyter des particules de grande taille (supérieure à 3 μm) (Tse *et al.*, 2003). Les phagosomes ne contiennent pas les protéines nécessaires à la dégradation des antigènes, ils fusionnent donc avec les lysosomes pour former un phagolysosome contenant la machinerie nécessaire à la présentation par le CMH de classe II (Stuart et Ezekowitz, 2005). Il est intéressant de noter que les antigènes phagocytés peuvent également être associés au CMH de classe I et être présentés aux lymphocytes T CD8⁺ par le mécanisme de cross-présentation. Ce mécanisme sera discuté ultérieurement.

L'autophagie est également un processus impliqué dans la présentation des antigènes. Les autophagosomes permettent le transport des protéines cytosoliques vers le compartiment de présentation antigénique (Crotzer et Blum, 2010) en fusionnant avec les vésicules de la voie endo-lysosomale pour former des auto-phagosomes (Schmid, Pypaert et Münz, 2008). Les DCs se distinguent des autres cellules présentatrices de l'antigène par leur fine régulation de l'activité protéolytique dans les compartiments de dégradation des protéines, tel que le phagolysosome. En effet, pour que les antigènes puissent être présentés, il ne faut pas qu'ils soient complètement dégradés. Contrairement aux macrophages, les lysosomes des DCs sont cinquante fois moins actifs, ce qui leur permet de maintenir des antigènes internalisés intacts plusieurs heures alors que les macrophages les dégradent rapidement (Delamarre *et al.*, 2005). Ainsi, il est important de maintenir un équilibre entre la dégradation des protéines pour la présentation antigénique et leur complète dégradation. Des protéases telles que les cathepsines (S, B, H et L) sont apportées dans le compartiment d'apprêtement de l'antigène pour permettre la dégradation des protéines exogènes

(Lautwein *et al.*, 2002). Dans les DCs, deux mécanismes contrôlent le pH. Le premier est la V-ATPase, qui est une pompe à protons. Elle permet l'entrée de protons à travers la membrane du phagosome et donc l'acidification du compartiment nécessaire au fonctionnement des protéases. Pour contrer une trop forte acidification, NOX2 (NADPH oxydase 2) induit une forte production de ROS (reactive oxygen species) qui consomme des protons et ainsi augmente le pH. L'équipe de Sebastian Amigorena a mis en évidence que les cellules déficientes pour NOX2 ont un pH phagosomal plus acide induisant une dégradation plus forte et une moins bonne présentation des antigènes. En augmentant le pH, NOX2 permet de prolonger l'intégrité des antigènes et donc leur chargement sur la molécule du CMH de classe I et II (Savina *et al.*, 2006).

Ainsi, les DCs sont capables de capter des protéines exogènes par plusieurs voies. Ces protéines sont internalisées dans des vésicules de la voie endo-lysosomale dont l'acidification est contrôlée pour permettre une dégradation optimale des protéines en peptides, pour être associés ensuite à la molécule du CMH II dans le compartiment MIIC.

7.6. Chargement du peptide sur la molécule du CMH de classe II

La molécule du CMH de classe II liée à la chaîne invariante est transportée dans le compartiment MIIC. La première étape pour le chargement du peptide est la dégradation d'une partie de la chaîne invariante par les cathepsines S et L (Hsing et Rudensky, 2005). Ces protéases vont dégrader partiellement la chaîne peptidique et préserver la liaison du peptide CLIP sur la molécule du CMH. Ensuite, le peptide CLIP est enlevé et un peptide exogène est chargé à sa place. Cette étape est catalysée par la glycoprotéine HLA-DM, de structure homologue à la molécule du CMH de classe II (**Figure 10**). Les chaînes de cette molécule sont codées par les gènes *DMA* et *DMB* et la molécule n'est présente que dans le compartiment MIIC. Il a été mis en évidence que la lignée cellulaire T2 n'est pas capable de charger les peptides exogènes. Dans une étude, l'équipe de Peter Cresswell a montré que ce défaut est restauré par l'expression de la molécule HLA-DM (Denzin *et al.*, 1994). Cette molécule restaure la stabilité et la conformation de la molécule HLA-DR et diminue le nombre de complexes HLA-DR-CLIP présent à la surface des cellules. HLA-DM induit un changement de conformation de la molécule du CMH de classe II, ce qui provoque la dissociation du peptide CLIP (Denzin et Cresswell, 1995). Lisa Denzin et Peter Cresswell ont mis en évidence que ce changement se fait dans des conditions de pH particulières (pH 4,5)

(Denzin et Cresswell, 1995). Le relargage du peptide CLIP permet à un peptide exogène de se fixer dans le sillon d'ancrage de la molécule HLA-DR. HLA-DM contrôle également les peptides qui sont chargés. En effet, la molécule peut changer les peptides de faible affinité par des peptides de plus forte affinité afin de générer uniquement des complexes CMH II-peptide de forte affinité (Blum, Wearsch et Cresswell, 2013). L'action d'HLA-DM ne se limite donc pas au remplacement du peptide CLIP par des peptides exogènes mais favorise également les complexes CMH II-peptide de fortes affinités.

L'action de HLA-DM est modulée par un autre hétérodimère $\alpha\beta$ de structure similaire à la molécule HLA-DR et nommée HLA-DO (**FIGURE 10**). Il a été mis en évidence que HLA-DO inhibe l'action de HLA-DM. HLA-DO a été identifié, dans un premier temps, dans les lymphocytes B, puis plusieurs études ont mis en évidence son expression dans les DCs humaines et murines (Hornell *et al.*, 2006; Fallas *et al.*, 2007). Bien qu'il soit accepté que HLA-DO inhibe HLA-DM, la fonction biologique de HLA-DO n'a pas été déterminée précisément (Blum, Wearsch et Cresswell, 2013).

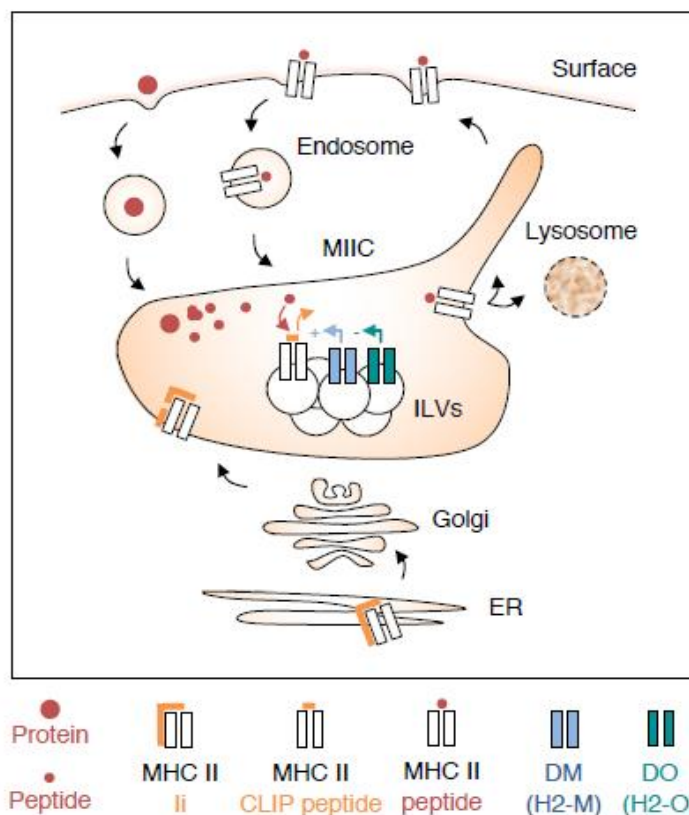


Figure 10 Représentation schématique de la présentation des antigènes exogènes par la voie du CMH de classe II. Les antigènes internalisés sont dégradés dans le MIIC puis chargés sur la molécule du CMH de classe II, à la place du peptide CLIP, grâce à la molécule HLA-DM. Les complexes CMHII-peptide sont ensuite envoyés à la membrane plasmique pour activer les lymphocytes T CD4⁺.

7.7. Transfert du complexe CMH II-peptide à la membrane plasmique

Les complexes CMH II-peptide sont transportés le long des microtubules. Un transport rapide des vésicules MIIC est réalisé par les protéines de la famille des dynéines (transport rétrograde vers la région périnucléaire) et des kinésines (transport antérograde vers la membrane plasmique). Les transports plus lents requièrent des protéines de la famille de la myosine. Ces transports sont contrôlés par les GTPases (Neefjes *et al.*, 2011). Il semble que les transports rétrogrades et antérogrades soient nécessaires pour le relargage des complexes à la surface (Neefjes *et al.*, 2011). Il apparaît que le transport rétrograde médié par les dynéines est contrôlé par la protéine RILP, elle-même contrôlée par la protéine ORP1L et la protéine résidente du réticulum endoplasmique VAPA (Rocha *et al.*, 2009). A l'inverse, l'activité des kinésines est contrôlée par la protéine Arl8b et conduit à l'élongation des lysosomes en tubules. Ces deux forces qui s'opposent conduisent à la fission des microtubules et à la libération des complexes CMH II-peptide à la membrane plasmique (Perrin *et al.*, 2019).

Il a également été montré que, dans les DCs, le transport des vésicules associées au compartiment MIIC est régulé par les signaux de maturation. En effet, suite à une activation, la majorité des molécules du CMH de classe II est envoyée à la membrane plasmique et le pool intracellulaire est diminué. Ainsi, une stimulation au LPS induit la mise en place de tubules émanant directement du MIIC et permettant le mouvement des vésicules vers la membrane plasmique. Il a été mis en évidence que la protéine ARF7 (également nommée ARL14) est impliquée dans cette voie de transport. Cette protéine localisée dans le compartiment MIIC recrute la protéine ARF7EP qui agit comme un récepteur pour la protéine motrice myosine 1E (Paul *et al.*, 2011).

7.8. Régulation de la voie du CMH de classe II par ubiquitination

Dans les DCs à l'état immature, à la suite de leur assemblage dans le MIIC, les complexes CMH II-peptide sont soit envoyés à la membrane plasmique, soit dégradés dans les lysosomes. Les molécules exposées à la surface sont endocytées pour être dégradées ou recyclées dans le compartiment MIIC afin d'être à nouveau chargés avec un peptide. Ainsi, à l'état immature, le renouvellement des complexes CMH-peptide à la surface est rapide. Ce renouvellement est dû à l'ubiquitination, un processus dans la régulation du CMH de classe II découvert relativement récemment. La chaîne β de la molécule du CMH de classe II présente

un motif lysine reconnu par l'ubiquitine E3 ligase c-MIR ou MARCH1. L'équipe d'Ira Mellman a montré que la chaîne β de la molécule du CMH II de DCs spléniques et de BMDC est effectivement liée à l'ubiquitine (Shin *et al.*, 2006). Les auteurs ont utilisé des DCs de souris génétiquement modifiées, dont la lysine de la chaîne β du CMH de classe II a été remplacée par une arginine. Il a été montré que, dans les cellules immatures, la majorité des molécules du CMH de classe II est localisée dans le compartiment endo-lysosomal MIIC. A l'inverse, dans les cellules mutées, la majorité des molécules est à la membrane plasmique. Ainsi, l'absence d'ubiquitination de la molécule du CMH de classe II entraîne une augmentation de la molécule à la surface cellulaire. De plus, l'équipe de Willem Stoorvogel a mis en évidence que l'ubiquitination de la molécule du CMH de classe II est nécessaire à son endocytose (van Niel *et al.*, 2006). Le maintien de la molécule du CMH de classe II à la surface des DCs mature apparaît donc en lien avec une diminution de l'endocytose et surtout une réduction importante de la dégradation des complexes CMH II-peptide. Ainsi, MARCH1 régule la présence de la molécule du CMH de classe II à la surface des DCs en induisant son endocytose (Shin *et al.*, 2006). De façon intéressante, il a également été montré que MARCH1 régule la dégradation du CD86 de la même façon que le CMH de classe II (Baravalle *et al.*, 2011).

Lors de la maturation des DCs, l'expression de MARCH1 est diminuée, ce qui augmente le temps d'expression des complexes CMH II-peptide à la surface des cellules. A l'inverse, un des effets de la cytokine immunorégulatrice IL-10 sur les DCs est l'augmentation de l'expression de MARCH1, ce qui favorise l'état fonctionnel immature caractérisé par le renouvellement élevé du CMH de classe II à la surface (Tze *et al.*, 2011).

8. Mécanisme de cross-présentation aux lymphocytes T CD8⁺

8.1. Généralités

Les peptides présentés par le CMH de classe I sont majoritairement des peptides endogènes, alors que les peptides présentés par le CMH de classe II sont d'origine exogène et sont internalisés. Pour que les lymphocytes T CD8⁺ soient activés et qu'une réponse antivirale ou anti-tumorale se développe, il faudrait que les DCs soient elles-mêmes infectées ou altérées. En 1976, Michael Bevan a mis en évidence une exception à ces règles. Il a montré que, lors d'une greffe chez la souris, les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent des antigènes polymorphes du greffon présentés par le CMH de classe I du receveur (Bevan 1976).

Autrement dit, les T CD8⁺ sont activés par des antigènes exogènes. Ce processus a été nommé cross-présentation.

La cross-présentation joue un rôle important dans la réponse anti-tumorale, dans certaines infections et dans la transplantation (Cruz *et al.*, 2017). Les peptides présentés par cette voie sont internalisés par les mêmes mécanismes que pour la présentation par la voie du CMH de classe II, c'est-à-dire, par macropinocytose, phagocytose et endocytose médiée par des récepteurs. Par exemple, il a été mis en évidence que la délétion du récepteur Clec9A a pour conséquence une diminution de la cross-présentation (Iborra *et al.*, 2012).

Deux voies intracellulaires ont été impliquées dans le processus de cross-présentation : l'une dite cytosolique et l'autre vacuolaire.

8.2. La voie cytosolique de cross-présentation

Le principal mécanisme de cross-présentation semble être la voie P2C, « phagosome to cytosole ». Dans cette voie, les protéines sont internalisées puis transférées dans le cytosole où elles sont dégradées en peptides par le protéasome (**Figure 11**). Il a été mis en évidence que la cross-présentation est bloquée par des inhibiteurs du protéasome, par la mutation du complexe TAP de transport dans le réticulum endoplasmique et par la bréfeldine A qui inhibe le transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1995). Les peptides issus du protéasome sont ensuite transportés dans le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP et chargés sur une molécule du CMH de classe I nouvellement synthétisée. Comme pour la présentation classique par la voie du CMH de classe I, les peptides générés sont clivés une deuxième fois pour que leur taille soit optimale pour leur chargement sur une molécule du CMH de classe I. Ainsi, les protéines ERAP1 et IRAP ont été impliquées dans la cross-présentation (Firat *et al.*, 2007).

Certains résultats ont montré de manière intéressante que le complexe TAP et les molécules du CMH de classe I peuvent également être recrutés dans les phagosomes et les endosomes. Ainsi, le chargement des peptides pourrait avoir lieu dans ces compartiments (Houde *et al.*, 2003). L'équipe de Sebastian Amigorena a mis en évidence un acteur majeur de l'interaction entre le réticulum endoplasmique et les phagosomes. SEC22B est une protéine SNARE, résidente du réticulum endoplasmique, nécessaire au transport des protéines de la voie du CMH de classe I du réticulum endoplasmique aux phagosomes (Cebrian *et al.*, 2011).

L'inhibition de l'expression de SEC22B entraîne un défaut de la cross-présentation mais pas de la présentation classique des peptides endogènes et exogènes. De plus, dans les DCs déficientes pour la protéine, le transfert des protéines des phagosomes au cytosol est inhibé et la dégradation dans les phagosomes est augmentée. Ainsi, l'apport des protéines du réticulum endoplasmique dans les phagosomes pourrait retarder la maturation des phagosomes et permettre le chargement du peptide (Cebrian *et al.*, 2011). Plus récemment, il a été montré que les souris déficientes pour SEC22B, spécifiquement dans les cellules CD11c⁺, ont un défaut de cross-présentation ayant pour conséquence un défaut d'initiation de la réponse T CD8⁺ anti-tumorale (Alloatti *et al.*, 2017).

L'étape de chargement du peptide de la voie cytosolique de cross-présentation peut donc se dérouler dans le réticulum endoplasmique et dans les phagosomes. Cette deuxième voie implique alors le transport des peptides issus du protéasome, du cytosol vers les phagosomes.

8.3. La voie vacuolaire de cross-présentation

A l'inverse de la voie cytosolique, la voie vacuolaire est résistante aux inhibiteurs du protéasome et est indépendante du complexe TAP. Par contre, cette voie est sensible aux inhibiteurs de la protéolyse lysosomale, en particulier les inhibiteurs des cathepsines S (Shen *et al.*, 2004). Comme précédemment, les antigènes sont internalisés dans les endosomes ou les phagosomes. La maturation de ces endosomes est ralentie et la progression vers les lysosomes est retardée. De cette manière, les antigènes sont dégradés dans les endosomes grâce aux cathepsines S puis chargés sur la molécule du CMH de classe I (Hari *et al.*, 2015) (**Figure 11**). Les complexes CMH-peptide sont ensuite envoyés à la membrane.

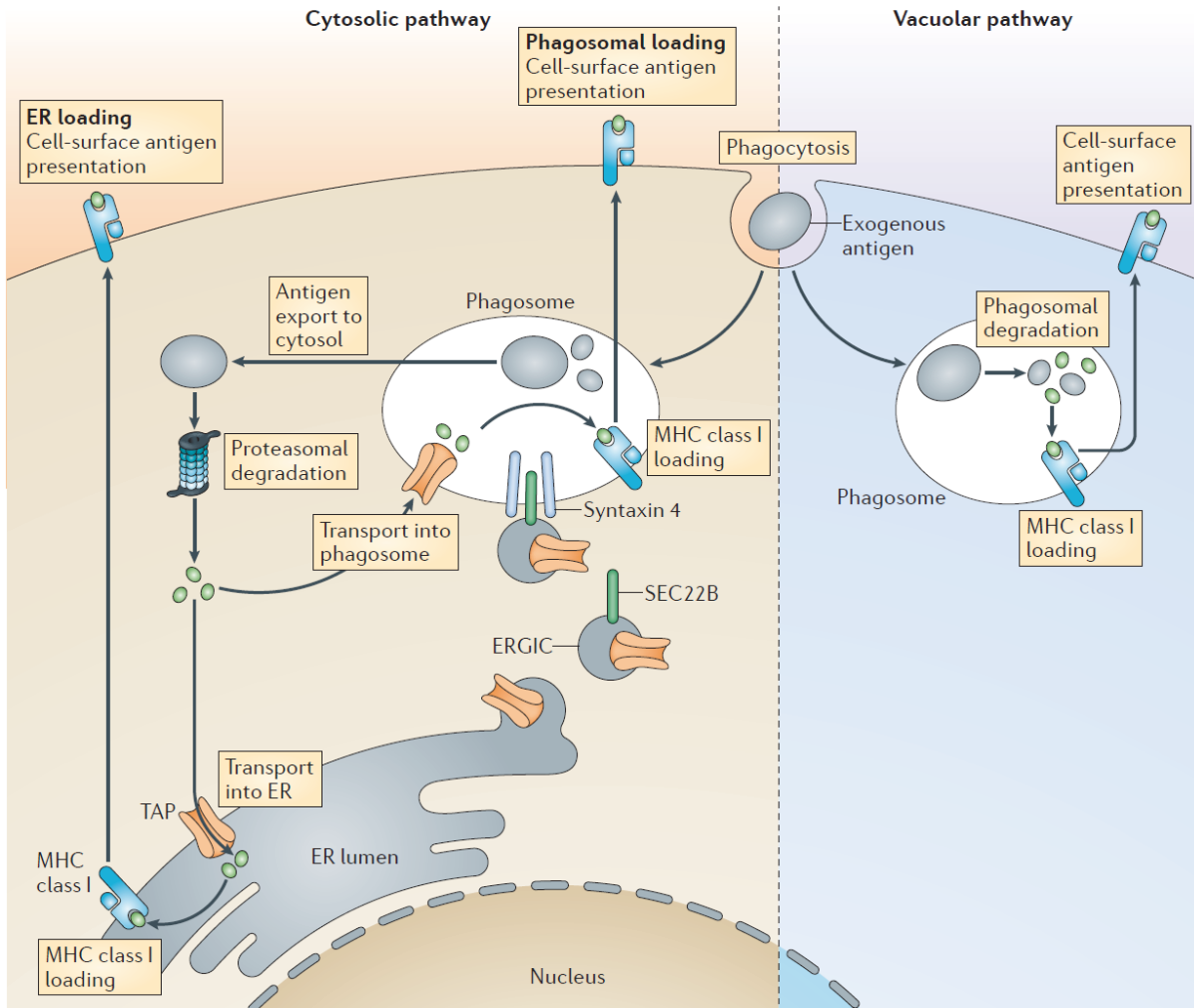


Figure 11 Représentation schématique de la cross-présentation des antigènes exogènes par la voie du CMH de classe I. Deux voies d'apprêtement des antigènes ont été décrites, une voie cytosolique et l'autre vacuolaire. Les complexes CMH-peptide sont ensuite envoyés à la membrane plasmique pour activer les lymphocytes T CD8⁺ (de Joffre et al., *Nature Immunology* 2012).

8.4. Origine des molécules du CMH I pour la cross-présentation

L'origine des molécules du CMH de classe I n'est pas entièrement comprise. Il a été proposé que ces molécules proviennent de la membrane plasmique et soient endocytées. La molécule du CMH de classe I présente un motif tyrosine au niveau du domaine intracellulaire, permettant l'internalisation de la molécule. Il a été montré que ce domaine serait nécessaire pour la cross-présentation (Lizée *et al.*, 2003). A l'inverse, il a été mis en évidence que la chaîne invariante participerait au transport des molécules du CMH de classe I nouvellement synthétisées du réticulum endoplasmique aux endosomes (Basha *et al.*, 2012).

Bien que les mécanismes de cross-présentation ne soient pas entièrement compris, ils ont été impliqués dans de nombreuses réponses immunes.

9. Recrutement des cellules dendritiques sur le site de l'inflammation

Lors d'un dommage tissulaire ou d'une inflammation localisée, les DCs peuvent être recrutées. Les chimiokines qui sont des cytokines à fonction chimiotactique, régulant le trafic des cellules immunitaires dans des conditions basales et inflammatoires, sont un élément essentiel dans le recrutement des DCs. Ainsi, les DCs expriment plusieurs récepteurs de chimiokines, notamment CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCL20 (Sozzani, 2005). Dans des conditions inflammatoires, les cellules résidentes et les cellules endothéliales activées vont sécréter des chimiokines telles que le CCL2, CCL5, CCL7, CCL13, CCL20. Les DCs exprimant leur récepteur, elles seront attirées. Par exemple, la chimiokine MIP-3 α /CCL20, est fortement sécrétée dans l'épithélium et recrute les progéniteurs des cellules de Langerhans. Chez l'homme, il a été mis en évidence que cette chimiokine est produite par les kératinocytes (Dieu-Nosjean *et al.*, 2000). Une fois sur le site, les DCs pourront à leur tour sécréter des chimiokines pour recruter d'autres acteurs immunitaires.

10. Activation des cellules dendritiques

Les DCs ont la capacité de reconnaître des pathogènes et de s'activer grâce à des récepteurs innés tels que les PRRs (pattern recognition receptors), les NOD-like récepteurs (nucleotide oligomerization domain - like receptors) et les C-type Lectins. Ces récepteurs reconnaissent une vaste gamme de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) et de DAMPs (damage-associated molecular patterns). Les PAMPs sont des molécules exprimées par différents pathogènes : les virus, les bactéries, les champignons et les protozoaires. Les DAMPs sont des molécules du Soi qui peuvent être altérées et qui sont relarguées par des cellules mourantes ou des cellules tumorales.

Parmi les PRR, les récepteurs les mieux connus sont les TLRs (toll-like receptors). Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par un domaine extracellulaire riche en leucine et un domaine cytoplasmique constitué du domaine TIR (TOLL/IL-1 receptor). Chez l'homme, dix TLRs ont été identifiés et douze chez la souris. Les TLR1, 2, 4, 5, 6 sont exprimés à la surface des cellules alors que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont situés dans les endosomes (Nishiya et DeFranco, 2004). La signalisation par les TLRs dans les DCs a

différents effets. Elle induit la survie des cellules, leur migration, la sécrétion de chimiokines et l'expression de récepteurs de chimiokines (Akira, 2003). Elle permet également l'augmentation rapide des molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Akira, 2003). La DC passe ainsi du stade immature au stade mature. Cette activation s'accompagne d'une augmentation de la capacité à migrer vers les organes lymphoïdes (Reis e Sousa, 2006).

Ces TLRs reconnaissent des ligands différents. Le TLR2 est essentiel pour la reconnaissance de nombreux PAMPs de bactéries à Gram-positif. Le TLR4 est impliqué dans la reconnaissance des lipopolysaccharides contenus dans les bactéries à Gram négatives. Le TLR4 ne reconnaît pas directement le LPS, mais s'associe aux molécules MD-2 et CD14. Le CD14 est un récepteur de haute affinité au LPS et la molécule MD-2 permet la signalisation du complexe. Il a été montré que le TLR5 détecte les flagellines des bactéries. Les TLR localisés dans les endosomes reconnaissent les acides nucléiques viraux et bactériens. Le TLR3 permet la détection des ARN double brin, produits par la plupart des virus au cours de leur réplication. Les ARN simple brin riches en uridine et guanosine sont reconnus par les TLR7 et 8. Enfin, les virus à ADN, tels que le cytomégalovirus ou le virus herpétique HSV sont reconnus par le TLR9 (Reis e Sousa, 2004). L'identification des ligands des TLRs a permis de générer des ligands synthétiques afin d'activer les DCs *in vitro*. Par exemple, le TLR3 est activé par le Poly:IC, les TLR7 et 8 par le R848 et le TLR9 par les CpG. De manière intéressante, les TLRs peuvent également s'associer les uns aux autres pour former des hétérodimères et augmenter le répertoire des ligands. Par exemple, les TLR2 et 6 reconnaissent des lipoprotéines diacétylées des bactéries.

La reconnaissance des ligands par les TLRs puis l'engagement de ces récepteurs induit l'activation de voies de signalisation aboutissant à la production de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I. Indépendamment de la voie de signalisation, le premier acteur est toujours le domaine TIR en recrutant des protéines adaptatrices, par exemple, MyD88 et TRIF. La voie de signalisation dépendante de MyD88 est commune à tous les TLRs sauf le TLR3 (Adachi *et al.*, 1998). MyD88 peut s'associer directement au domaine TIR ou par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice TIRAP (Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2002). Ensuite, MyD88 recrute les kinases IRAK1 et IRAK4, qui à leur tour recrutent TRAF6. D'autres kinases sont impliquées dans la voie de signalisation dont le résultat est l'activation de NF- κ B et d'AP1 conduisant à la production du TNF α , l'IL-1 et l'IL-12 (Wang *et al.*, 2001) et d'IFN de

type 1. La stimulation des TLR3 et 4 peut également induire le recrutement de la protéine adaptatrice TRIF (Hoebe *et al.*, 2003). TRIF interagit avec les protéines TRAF6 et TRAF3. La voie TRAF6 induit la production de cytokines pro-inflammatoires. A l'inverse TRAF3 active la kinase TBK-1 qui phosphoryle le facteur de transcription IRF-3. Ce facteur de transcription active la transcription des gènes IFN (Kawasaki et Kawai, 2014).

Ainsi, les DCs expriment un large panel de récepteurs pouvant reconnaître différents ligands. De cette manière, ces cellules sont capables de contrôler leur environnement et d'initier une réponse immunitaire en cas d'activation.

11. Migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes

Lorsque les DCs captent les antigènes en périphérie, elles migrent par le sang ou la lymphe vers les organes lymphoïdes pour présenter les antigènes aux lymphocytes T. En passant du stade immature au stade mature, les cellules acquièrent l'expression de récepteurs aux chimiokines, notamment le CCR7 (Dieu *et al.*, 1998). Ce récepteur leur confère une sensibilité aux chimiokines CCL19 et CCL21. CCL21 est constitutivement exprimée par les HEV (high endotheliale venules), CCL19 et CCL21 sont produites par les cellules stromales des zones T des organes lymphoïdes (Gunn *et al.*, 1998). Ainsi, les DCs migrent vers les organes lymphoïdes. L'importance de cette communication entre le CCR7 et ses ligands dans le recrutement des DCs dans les organes lymphoïdes a été mise en évidence chez les souris déficientes pour le CCR7. Ces animaux présentent une forte altération du recrutement des DCs après leur activation (Förster *et al.*, 1999). En suivant les gradients de CCL19 et de CCL21, les DCs migrent dans les mêmes zones que les lymphocytes T naïfs qui expriment constitutivement le CCR7. Cette colocalisation permet une interaction optimale entre les cellules présentatrices des antigènes et les lymphocytes T.

Des études ont montré qu'il y a une différence de localisation des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ dans la rate et les ganglions. Dans les ganglions, les CD4⁺ sont situés dans la zone de contact des cellules T et B alors que les CD8⁺ se concentrent plus en profondeur dans la zone T (Eisenbarth, 2019). Cette localisation différentielle s'accompagne également de la ségrégation des sous-populations de cDCs. Ainsi, les cellules cDC1 qui activent les T CD8⁺ sont localisées dans la zone T et les cDC2 se concentrent dans la zone de contact T-B (Eisenbarth, 2019). De manière similaire, dans la rate, les cDC1 sont situées dans la zone des lymphocytes T, au centre de la pulpe blanche. Les cDC2 sont localisées plus à

l'extérieur, à la limite entre la pulpe blanche et la pulpe rouge (Eisenbarth, 2019) (**Figure 12**). Cette différenciation de localisation a été directement impliquée dans la captation des antigènes et l'activation des lymphocytes T. En effet, dans les ganglions, il a été mis en évidence que les cDC2 qui sont plus proches du sinus lymphatique captent davantage les antigènes que les cDC1 qui sont situés plus en profondeur dans le cortex (Gerner *et al.*, 2017). Cette différence n'est pas intrinsèque aux deux sous-populations de DCs comme l'ont décrit les auteurs, mais uniquement due à la différence de localisation. Ainsi, la position des cDCs dans les ganglions induit la spécialisation des régions pour la présentation par la voie du CMH de classe I et II et, par conséquent, des zones préférentielles d'activation des T CD8⁺ et des T CD4⁺.

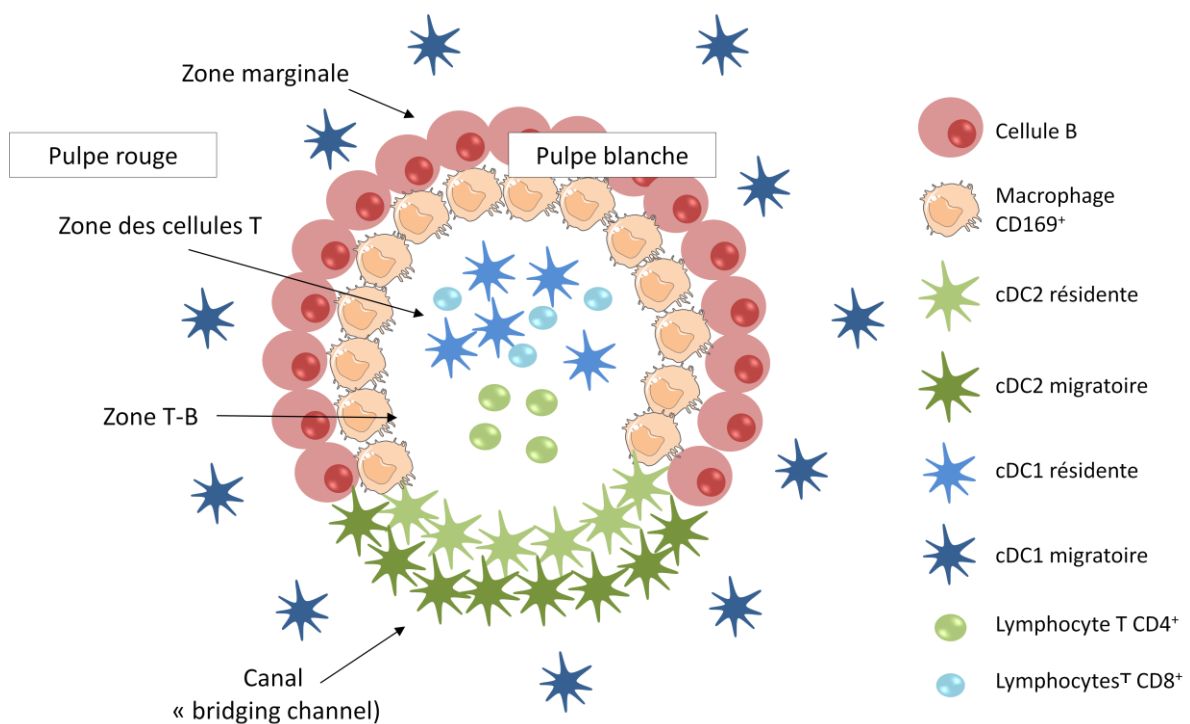


Figure 12 Représentation schématique de la répartition des DCs et des lymphocytes dans la rate. Les cDC1 et les lymphocytes T CD8⁺ sont localisés plus en profondeur dans la pulpe blanche alors que les cDC2 et les lymphocytes T CD4⁺ sont situés à la frontière entre la pulpe blanche et la pulpe rouge (réalisée selon Eisenbarth, *Nature Immunology* 2019).

12. Activation des lymphocytes T

Les DCs présentent de manière constitutive des antigènes à leur surface, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène. Les antigènes exogènes peuvent induire une réponse immunitaire de deux manières. Ils peuvent être localisés en périphérie. Dans ce cas, les DCs migratoires présentes dans le tissu ou recrutées sur le site de l'inflammation captent ces

antigènes pathogènes. Elles deviennent alors matures et migrent vers les organes lymphoïdes. Les antigènes sont transférés aux DCs résidentes des organes lymphoïdes pour les présenter aux lymphocytes T (Allan *et al.*, 2006). Dans le second cas, les antigènes peuvent également être filtrés dans les organes lymphoïdes où ils sont présentés par les DCs résidentes.

Les DCs présentes dans les organes lymphoïdes secondaires, qu'elles soient résidentes ou migratoires, sont les seules APC capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Les DCs présentent sur leur membrane les complexes CMH-peptide. Ces complexes seront scannés par les lymphocytes T. Lorsqu'un lymphocyte T possède un TCR spécifique (avec suffisamment d'affinité), une synapse immunologique va se former et le lymphocyte sera activé. Pour activer un lymphocyte T, trois signaux sont nécessaires (**Figure 13**).

Le premier signal est la liaison du TCR avec le complexe CMH-peptide. Cette interaction induit la phosphorylation par la Lck kinase du motif ITAM (immunorecepteur tyrosine-based activation motif) du CD3. Le CD3 étant localisé à proximité du TCR. Le signal 2 requiert l'interaction de molécules de costimulation telles que le CD80 ou CD86 à la surface des DCs avec le CD28 présent à la surface des lymphocytes T. Plusieurs molécules sont impliquées telles que LFA-1/ICAM-1, CD2/LFA-3. Le signal 2 est extrêmement important pour l'activation des lymphocytes. En présence du signal 1 mais pas du signal 2, les cellules T entrent dans un état d'anergie et deviennent insensibles à toutes nouvelles stimulations, ce qui conduit à la tolérance de l'antigène (Steinman, Hawiger et Nussenzweig, 2003). De plus, ce signal 2 peut être activateur ou inhibiteur. En effet, les molécules citées précédemment sont activatrices alors que l'interaction CD80/CTLA-4 et CD86/CTLA-4 est inhibitrice. Il a été mis en évidence que les souris déficientes pour CTLA-4 présentent une forte lympho-prolifération, conduisant à une infiltration des tissus et à la mort des animaux avant quatre semaines (Tivol *et al.*, 1995). Ainsi, les molécules de costimulation peuvent réguler la réponse T induite par les DCs et freiner leur prolifération. Le troisième signal est fourni par les cytokines produites à la fois par les DCs et les cellules T elles-mêmes. L'IL-2 est une cytokine clé dans l'induction de la prolifération des cellules T. Les signaux de costimulation induisent la transcription du gène de l'IL-2 et de son récepteur le CD25.

Les cytokines sécrétées par les DCs vont également permettre de polariser la réponse T CD4 et ainsi d'induire une réponse spécifique au type d'antigène présenté. Par exemple, selon le TLR qui est activé, une voie de signalisation sera induite et permettra la sécrétion de

certaines cytokines. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente sur les cellules ROR γ t, l'IL-12 et l'IFN γ sont nécessaires à l'induction des Th1. En ce qui concerne les Th2, il s'agit de l'IL-4 ; pour les Th17, il s'agit de l'IL-6 et du TGF β et, enfin, pour induire des Treg, les DCs sécrètent du TGF β et de l'IL-2.

Les DCs ont un rôle crucial dans l'induction de la réponse T primaire en exprimant l'ensemble des signaux nécessaires à une activation optimale des lymphocytes.

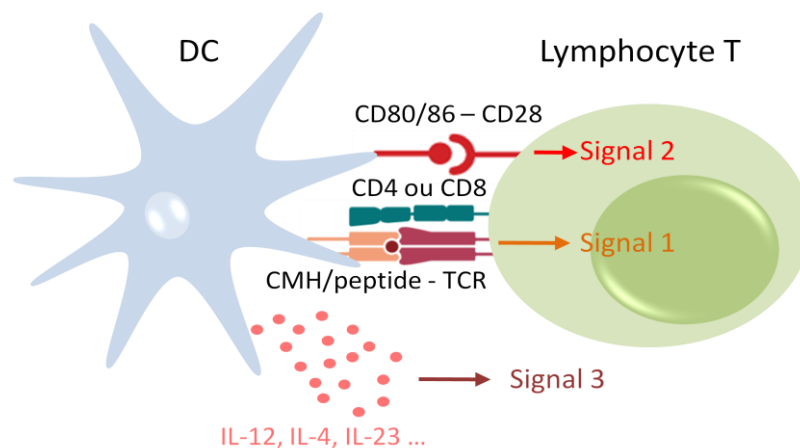


Figure 13 Représentation de l'interaction entre une DC et un lymphocyte T. Les signaux 1, 2 et 3 sont nécessaires pour l'activation efficace d'un lymphocyte T.

13. Le rôle tolérogénique des cellules dendritiques

Les DCs sont impliquées dans le déclenchement de la réponse immunitaire effectrice mais sont également impliquées dans la réponse tolérogénique. Ce rôle a été mis évidence dans la sélection négative dans le thymus. Les DCs participent à la sélection négative des lymphocytes T. Elles expriment à leur surface des antigènes du Soi et induisent la mort des lymphocytes T dont le TCR est spécifique de ces antigènes (Brockner, Riedinger et Karjalainen, 1997). Ainsi, les lymphocytes auto-réactifs sont éliminés. Ces DCs thymiques se distinguent des autres sous-populations en étant issues d'un précurseur présent dans le thymus, non pas dans la moelle osseuse, et en restant dans le thymus toute leur vie (Shortman et Liu, 2002).

En présentant des antigènes du Soi dans les organes lymphoïdes secondaires, les DCs sont également capables d'induire une réponse tolérogénique en périphérie. Cette population tolérogène ou tolDC est constituée de DCs naïves (iDCs) et de cellules dites semi-matures résistantes aux signaux de maturation (Devi et Anandasabapathy, 2017). Ces DCs induisent une réponse tolérogénique spécifique d'un antigène par différents mécanismes : délétion

des lymphocytes T, anergie et polarisation en cellules T régulatrices (Hasegawa et Matsumoto, 2018).

Cette capacité tolérogénique des DCs est particulièrement importante dans certains organes tel que le tractus intestinal. Dans cette muqueuse, une tolérance se met en place envers les antigènes alimentaires et les bactéries commensales. La tolérance aux aliments est nommée tolérance orale. Dans l'intestin, les cellules sont présentes dans la lamina propria, les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les ganglions mésentériques. Il a été montré, dans un modèle de tolérance orale, que les DCs sont indispensables à l'induction de cellules T régulatrices (« peripheral Tregs »). Parmi les DCs, il a été mis en évidence que la sous-population CD103⁺CD11b⁻ est plus efficace dans l'induction des Treg en sécrétant de fortes quantités de TGFβ (Esterházy *et al.*, 2016).

Actuellement, différents types de DCs tolérogéniques sont en cours d'études en clinique (Moreau *et al.*, 2017). Par exemple, notre équipe étudie les ATDC, des cellules dérivées *in vitro* ayant des capacités tolérogéniques en transplantation. Ces cellules sont en phase I/II d'essai clinique en transplantation rénale (Moreau *et al.*, 2012).

14. Les canaux ioniques dans les cellules dendritiques

Les mécanismes cellulaires que je viens de décrire comme la présentation antigénique sont dépendants de facteurs moléculaires. Ils peuvent également être dépendants de signaux ioniques. Dans les DCs, comme dans d'autres cellules immunitaires, il a été mis en évidence que le Ca²⁺ a un rôle majeur. L'inhibition non sélective du Ca²⁺ inhibe de nombreuses fonctions comme la phagocytose, l'activation de l'inflammasome et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ par la voie du CMH de classe II (Vaeth *et al.*, 2015).

L'un des canaux calcique les plus étudiés est le canal CRAC (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺). Ce canal permet l'entrée d'ion Ca²⁺ à travers la membrane plasmique et a été décrit comme un processus majeur lors de l'activation des lymphocytes T. La stimulation du TCR d'un lymphocyte T entraîne l'activation de la PLCγ (phospholipase C γ), la production d'IP3 (1,4,5-inositol triphosphate) et, ainsi, l'ouverture du canal récepteur de l'IP3 dans la membrane du réticulum endoplasmique. L'ouverture de ce canal entraîne un relargage de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique vers le cytosol et donc une augmentation transitoire du Ca²⁺ intracellulaire et une diminution de la concentration dans le réticulum (Feske, Wulff et Skolnik, 2015). Cette dernière induit l'activation des protéines transmembranaires STIM1 et

STIM2 localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique qui en se liant à ORAI1, une sous-unité du CRAC, entraînent l'activation du canal résultant en l'entrée de Ca^{2+} . Ce processus est nommé SOCE (Store-operated Ca^{2+} entry) (Feske, Wulff et Skolnik, 2015). Ce mécanisme a également été mis en évidence dans d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes B et les neutrophiles, par exemple.

En 2001, l'équipe de Gerard Ahern a mis en évidence que, dans les DCs, la source majeure de Ca^{2+} est les canaux SOCE (Hsu *et al.*, 2001). De plus, l'inhibition de la protéine STIM1 inhibe la cross-présentation, la maturation des phagosomes et la migration des DCs *in vitro* et *in vivo* (Nunes-Hasler *et al.*, 2017). De manière similaire, l'étude d'une protéine UNC93B1 (uncoordinated 93 homolog B1) a montré qu'elle s'associe avec STIM1, ce qui induit un flux calcique nécessaire à la cross-présentation (Maschalidi *et al.*, 2017). En effet, l'utilisation d'une souris présentant une mutation non fonctionnelle d'UNC93B1 a mis en évidence un défaut de cross-présentation lié à une diminution de la dégradation dans les phagosomes, une augmentation du pH des endosomes et des phagosomes et un défaut fonctionnel de STIM1. Il a été mis en évidence que UNC93B1 et STIM1 interagissent dans le réticulum endoplasmique, ce qui permet l'oligomérisation et l'activation de STIM1 (Maschalidi *et al.*, 2017). Ainsi, STIM1 serait fonctionnel et pourrait avec STIM2 activer le canal CRAC permettant une entrée de Ca^{2+} .

Néanmoins, le rôle du mécanisme SOCE dans les DCs est controversé. En effet, l'équipe de Stefan Feske a mis en évidence en utilisant des souris déficientes pour *Stim1* et *Stim2* donc en inhibant le mécanisme SOCE, qu'aucun défaut fonctionnel majeur n'a été observé. Ainsi, STIM1, STIM2 et SOCE ne seraient pas nécessaires au fonctionnement des DCs. Dans cette étude, des résultats similaires ont été observés pour les macrophages (Vaeth *et al.*, 2015).

Bien que ces résultats soient contradictoires, il est indéniable que les canaux ioniques ont un rôle clé dans les fonctions des DCs. Notamment, ces cellules régulent de manière très fine leur pH, par exemple pour la dégradation optimale des peptides dans les endosomes. Cependant, les canaux cationiques capables d'induire un courant de cations, notamment Na^+ , contraire (courant contre-ionique) favorisant l'entrée de protons permise par la v-ATPase vacuolaire ne sont pas clairement caractérisés. L'identification et la compréhension du rôle de nouveaux canaux ioniques pourraient mettre en évidence des mécanismes de régulation originaux des DCs et ainsi représenter de potentielles cibles thérapeutiques.

C. Etude de deux canaux ioniques dans le système immunitaire : TMEM176A et TMEM176B

1. Identification de *Tmem176b* dans un modèle d'allogreffe chez le rat

La compréhension du fonctionnement du système immunitaire est fondamentale pour mettre en évidence de nouveaux mécanismes effecteurs et régulateurs pouvant conduire à de nouvelles voies thérapeutiques. Dans le cadre de la transplantation, comprendre quels mécanismes ou quels facteurs permettraient d'inhiber le rejet de greffe est essentiel pour prévenir ce rejet et améliorer la survie des greffons.

Dans cet objectif, notre équipe s'est intéressée à un modèle animal dans lequel le rejet d'allogreffe cardiaque est inhibé par transfert de sang du donneur (TSD) avant la greffe (Josien *et al.*, 1998). Ce modèle a été réalisé chez le rat. Les gènes différentiellement exprimés entre les greffons non rejetés grâce à la TSD et les greffons rejetés ont été analysés (Louvet *et al.*, 2005). Cette étude a mis en évidence plusieurs gènes plus fortement exprimés dans les greffons non rejetés, qui pourraient donc participer aux mécanismes de non rejet du greffon.

Notre équipe s'est concentrée sur un gène en particulier, plus fortement exprimé dans les greffons tolérés et de fonction complètement inconnue (**Figure 14**). Ce gène a été nommé *Torid* pour Tolerance Related and InduceD transcript (Louvet *et al.*, 2005) puis, plus tard, a été nommé *Tmem176b* dans la nomenclature officielle. *Tmem176b* est également exprimé chez la souris et chez l'homme (*TMEM176B*), avec une forte similarité entre les espèces.

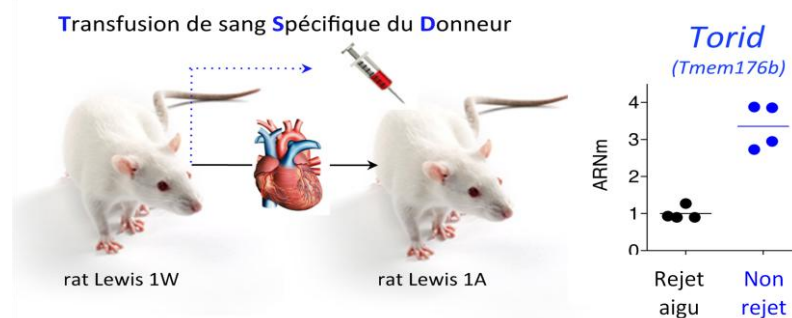


Figure 14 Surenexpression de *Tmem176b* dans les allogreffes cardiaques non rejetées chez les rats receveurs traités par TSD en comparaison des contrôles en rejet aigu (Figure réalisée selon Louvet *et al.*, American Journal of Transplantation. 2005).

Dans le modèle d'allogreffe cardiaque, notre équipe a montré que *Tmem176b* est exprimé dans les cellules non-T infiltrant les greffons tolérés (depuis des travaux ont montré qu'il ne

s'agit pas d'une véritable tolérance mais d'une inhibition du rejet aigu, laissant place au développement progressif d'un rejet chronique). Cette infiltration se passe, durant les premiers jours après transplantation, seulement chez les animaux traités (Louvet *et al.*, 2005). L'analyse par RT-qPCR de différents types cellulaires a montré que ce gène est fortement exprimé par les cellules myéloïdes, plus spécifiquement les DCs et les macrophages. *In vitro*, notre équipe a également montré que son expression est diminuée dans les DCs suite à une stimulation (LPS ou Poly :IC) (Louvet *et al.*, 2005). Ces deux éléments ont suggéré, à l'époque, l'hypothèse que TMEM176B pourrait favoriser la présentation tolérogénique d'antigènes par les cellules présentatrices (DCs et macrophages) dans un état immature.

2. *Tmem176a*, le gène homologue de *Tmem176b*

Suite à la mise en évidence de *Tmem176b* chez le rat, notre équipe a cherché s'il existait des séquences protéiques similaires. De manière très intéressante, une forte homologie entre TMEM176B et la protéine HCA112 (28,5% d'homologie) a été observée, chez l'homme (Louvet *et al.*, 2005). Cette protéine a été mise en évidence pour la première fois dans une étude portant sur l'identification d'antigènes exprimés par les cellules tumorales dans le carcinome hépatocellulaire, d'où le nom HCA112 (hepatocellular carcinoma-associated antigen 112) (Wang *et al.*, 2002). Par la suite, cette protéine a été nommée TMEM176A dans la nomenclature officielle. Elle est exprimée également chez la souris et le rat.

Tmem176a et *b* sont situés sur le même locus chromosomique et transcrits en direction opposée, ils partagent la même organisation intron-exon et présentent une structure protéique similaire (Louvet *et al.*, 2005) (**Figure 15**). Ces arguments ont permis de mettre en évidence que *Tmem176a* et *b* sont deux gènes homologues. Les travaux d'un autre groupe ont montré que les deux gènes sont fortement conservés entre les espèces. Ils ont été mis en évidence dans le génome de l'ensemble des mammifères et chez les poissons osseux (Zuccolo *et al.*, 2010).

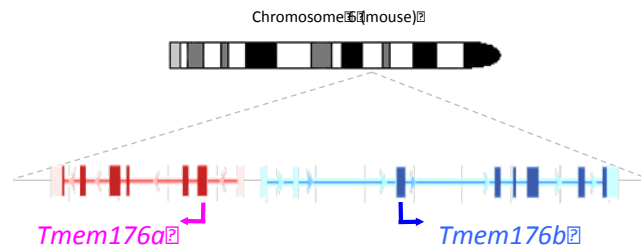


Figure 15 Les homologues Tmem176a et Tmem176b sont situés sur le même locus chromosomique en direction opposée et ne sont séparés que par 3,8 kb. Chez la souris les gènes sont portés par le chromosome 6.

D'un point de vue structural, TMEM176A et B sont des protéines à quatre domaines transmembranaires (**Figure 16**). Il n'a pas été établi de lien entre ces deux protéines et la famille des tetraspanines (par exemple TSP-1 ou CD63) qui sont également des protéines transmembranaires à quatre domaines présentes à la surface des cellules. Par contre, ces gènes ont été associés, mais seulement de façon très distante, à la famille MS4A (membrane-spanning 4-domains subfamily A) dont font également partie le CD20, FcεRIβ et 13 autres gènes (Louvét *et al.*, 2005). Une étude s'est intéressée à la phylogénie au sein de la famille MS4A et avec TMEM176A et B (Zuccolo *et al.*, 2010). Les gènes *Tmem176a* et *b* présentent des régions fortement conservées avec les gènes *MS4A*. Néanmoins, ils sont situés sur des chromosomes différents, et ceci chez plusieurs espèces (mammifères et poissons osseux). D'un point de vue phylogénétique, *Tmem176a* et *b* sont plus proches entre eux qu'avec les gènes de la famille *MS4A*. Ainsi, *Tmem176a* et *b* et les gènes *MS4A*, seraient issus d'un ancêtre commun et auraient ensuite divergé (Zuccolo *et al.*, 2010).

Il a également été montré que TMEM176B peut interagir avec lui-même pour former un homodimère et avec TMEM176A pour former un hétérodimère (Condamine *et al.*, 2010). Ces résultats ont été obtenus par la technique du double hybride et ont été confirmés par une autre équipe par la technique d'immunoprécipitation (Cuajungco *et al.*, 2012).

Peu d'informations sont connues sur ces deux gènes homologues. La majorité des études dans lesquelles sont associés *Tmem176a* et *b* ont mis en évidence leur expression, soit dans des types cellulaires, soit dans des pathologies. Néanmoins, peu d'études fonctionnelles ont été réalisées sur ces protéines.

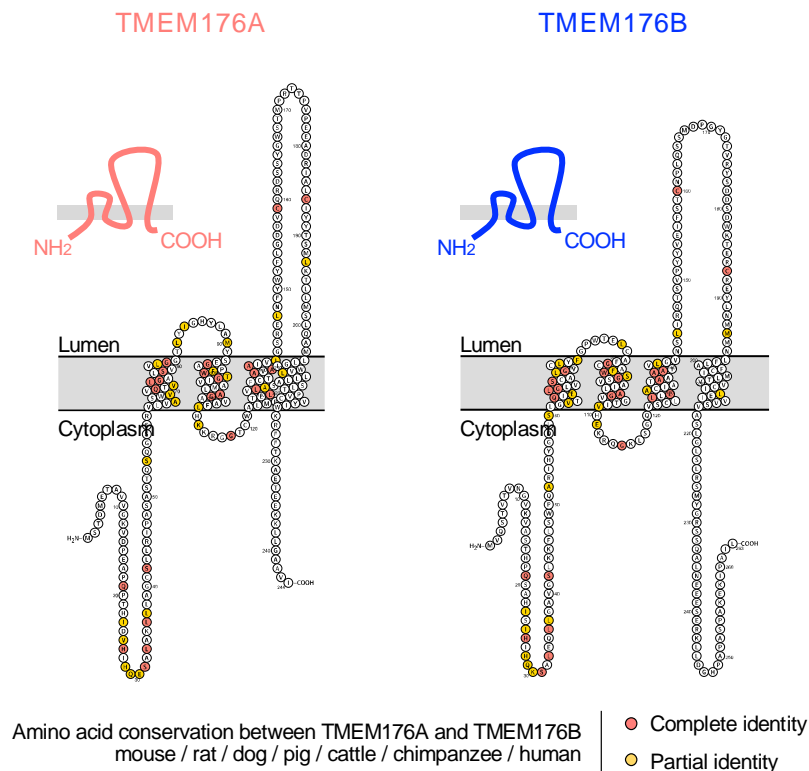


Figure 16 Les protéines TMEM176A et TMEM176B sont des protéines intracellulaires de structure homologue possédant quatre domaines transmembranaires. Les acides aminés les plus conservés entre les deux molécules et parmi plusieurs espèces sont mis en couleur et sont principalement concentrés dans les trois premiers domaines transmembranaires et dans la région N-terminale.

3. Expression tissulaire et cellulaire de *Tmem176a* et *b*

3.1. Expression basale dans différents organes et types cellulaires

Tmem176a et *Tmem176b* sont exprimés principalement dans la rate, les ganglions, le colon, l'intestin, le foie, les reins et les poumons, à différents niveaux d'expression selon l'espèce (homme, rat et souris) (Louvet *et al.*, 2005; Condamine *et al.*, 2010.).

Plusieurs études ont montré l'expression de *Tmem176a* et *b* dans différents types cellulaires en dehors du système immunitaire. Par exemple, le gène TMEM176B a été initialement isolé chez l'homme, dans des fibroblastes de poumons et nommé LR8 (Lurton *et al.*, 1999). En 2006, l'équipe de Takeshi Takohusi a également isolé ce gène et l'a nommé *Clast1*. Cette équipe a mis en évidence que *Tmem176b* est exprimé dans les précurseurs des cellules granulaires du cervelet (Maeda *et al.*, 2006). De manière intéressante, en générant des souris déficientes (dans le fond génétique 129/FV), il a été observé que 65% de ces souris présentaient une ataxie sévère du cervelet. Néanmoins, la fonction de *Tmem176b* dans ces cellules n'a pas été mise en évidence.

En ce qui concerne son homologue, *Tmem176a*, son expression a été initialement décrite dans les cellules tumorales de carcinome hépatocellulaire chez l'homme (Wang *et al.*, 2002). Ce gène a également été identifié dans une étude s'intéressant à l'impact de la protéinurie sur les cellules du tube proximal rénal (ici nommé GS188) (Nakajima *et al.*, 2002). Un modèle murin dans lequel les animaux ont reçu des injections d'albumine de sérum bovin pour mimer une protéinurie a été utilisé. L'analyse des gènes différentiellement exprimés entre les cellules du tube proximal de souris, traitées et non traitées, a été réalisée. Il a été mis en évidence une surexpression de *Tmem176a* dans les cellules traitées. Plus récemment, les travaux de l'équipe d'Evan Rosen ont suggéré l'implication de *Tmem176a* dans les adipocytes dans la résistance à l'insuline (Kang *et al.*, 2015). Cette équipe a analysé l'expression des gènes et la régulation épigénétique dans deux modèles d'induction de la résistance à l'insuline. Ces résultats suggèrent que *Tmem176a* serait impliqué dans la résistance à l'insuline après stimulation des cellules au dexamétasone. De plus, *Tmem176a* et *b* sont surexprimés dans le tissu adipeux de souris diabétiques (souris ob/ob) (Kang *et al.*, 2015).

Tmem176a et *Tmem176b* sont donc des homologues strictement co-exprimés (ils partagent probablement le même promoteur) et présents dans des cellules très diverses en dehors des cellules hématopoïétiques. Ces gènes participent certainement à un processus cellulaire universel s'adaptant aux besoins de certains types cellulaires.

3.2. Expression dans le système immunitaire

De façon surprenante, au sein des cellules hématopoïétiques, ces deux gènes sont fortement exprimés à la fois dans des cellules myéloïdes immatures et dans certaines cellules lymphoïdes.

Historiquement, notre équipe a mis en évidence qu'ils sont exprimés dans les cellules myéloïdes, plus particulièrement dans les cDCs et à un niveau plus faible dans les macrophages mais très peu dans les pDCs (Louvet *et al.*, 2005; Condamine *et al.*, 2010). Il a également été montré que *Tmem176b* est exprimé dans la microglie (Schmid *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été mis en évidence que *Tmem176a* et *b* sont exprimés dans des cellules lymphoïdes, les cellules de l'immunité de type 17, incluant les Th17, les ILC3, par exemple (Drujont *et al.*, 2016). Par ailleurs, ces gènes apparaissent relativement fortement

exprimés dans plusieurs progéniteurs hématopoïétiques tels que le progéniteur myéloïde commun et le progéniteur lymphoïde commun (Vandenbon *et al.*, 2016a) (**Figure 17**).

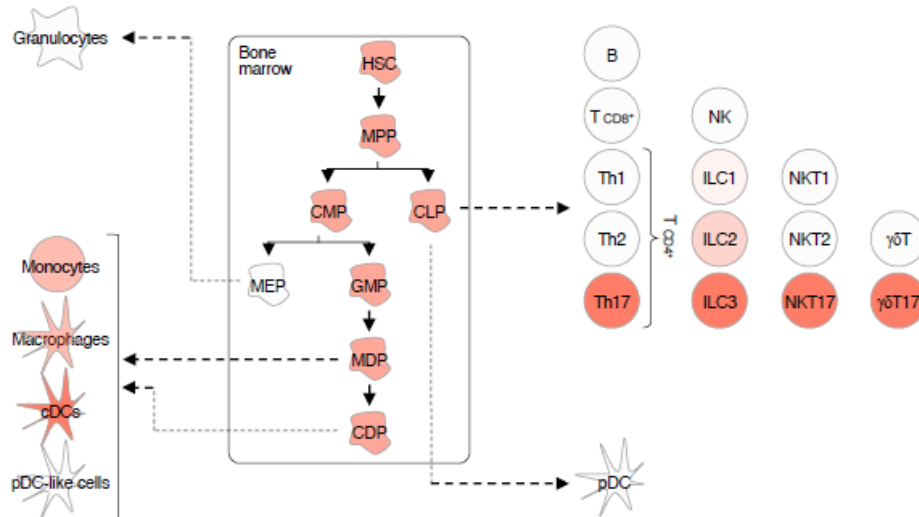


Figure 17 Représentation schématique de l'expression de *Tmem176a* et *b* dans les cellules du système immunitaire. L'expression la plus forte des gènes est associée à la couleur rouge foncé.

3.3. *Tmem176a* et *b* sont fortement exprimés dans les cellules dendritiques

Initialement, notre équipe a identifié *Tmem176a* et *b* dans les cellules myéloïdes (Louvet *et al.*, 2005). Parmi les cellules myéloïdes, les deux gènes sont fortement exprimés dans les cDCs et, dans les macrophages, à un niveau plus faible. Par contre, ils sont très faiblement exprimés dans les monocytes et dans les pDCs (Louvet *et al.*, 2005; Condamine *et al.*, 2010). Ces résultats ont également été confirmés par des données publiques, par exemple la base de données Immuno-Navigator (**Figure 18**). De manière intéressante, dans les pDCs, des travaux ont mis en évidence que le facteur de transcription E2-2, qui est spécifique des pDCs comme nous l'avons vu dans la partie précédente, peut se lier directement à *Tmem176a* afin de réprimer son expression et de permettre la différenciation en pDCs (Ghosh *et al.*, 2010). Autrement dit, *Tmem176a* serait un gène spécifique de la différenciation des cDCs et serait inhibé pour permettre la différenciation des pDCs.

Au sein des cDCs, différentes études mettent en évidence l'expression de *Tmem176a* et *b* dans différentes sous-populations. Chez la souris, deux analyses en single cell RNA seq des

différentes sous-populations de cDCs, ont montré une expression préférentielle de *Tmem176a* et *b* dans les cDC2 (Crozat *et al.*, 2011; Jaitin *et al.*, 2014).

Les DCs produisent les cytokines capables d'orienter la réponse T CD4⁺ en Th1, Th2 et Th17. L'équipe de Ruslan Medzhitov s'est intéressée à la caractérisation des DCs induisant la réponse Th2 en utilisant des BMDC (Gao *et al.*, 2013). Il a été mis en évidence que *Tmem176a* et *b* sont préférentiellement exprimés dans les BMDC PDL2⁺ qui induisent une réponse Th2.

Chez l'homme, plusieurs études se sont également intéressées à la caractérisation des sous-populations de DCs. Il a été montré que *TMEM176B* est plus fortement exprimé dans les DC3 (CD1C⁺ ayant une signature distincte par l'expression de gènes de l'inflammation aigüe et chronique) en comparaison aux DC2 non inflammatoires (Villani *et al.*, 2017). Récemment, l'équipe de Matthew Krummel s'est intéressée à la réponse T CD4⁺ anti-tumorale (Binnewies *et al.*, 2019). Il a été montré, chez la souris, que les cDC2 migratoires pourraient induire la réponse T CD4⁺ anti-tumorale en absence des Treg. L'analyse en single cell RNAseq des cellules cDC2 migratoires dans le ganglion drainant à proximité de la tumeur de souris contrôles et de souris déficientes en Treg, a montré une diminution de l'expression de *Tmem176a* et *b* dans les deux-sous-populations de cDC2. Ainsi, la modification du microenvironnement tumoral (associée à une réponse et une survie meilleures) pourrait induire la diminution de l'expression de *Tmem176a* et *b*. Ces cellules ont également été mises en évidence chez l'homme. *TMEM176A* et *B* ont été associés à une sous-population des cDC2 migratoires dans les ganglions drainants chez des patients atteints de mélanome (Binnewies *et al.*, 2019).

Ainsi, différentes études menées par notre équipe et également dans d'autres laboratoires ont mis en évidence la forte expression de *Tmem176a* et *b* dans les cDCs, aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme.

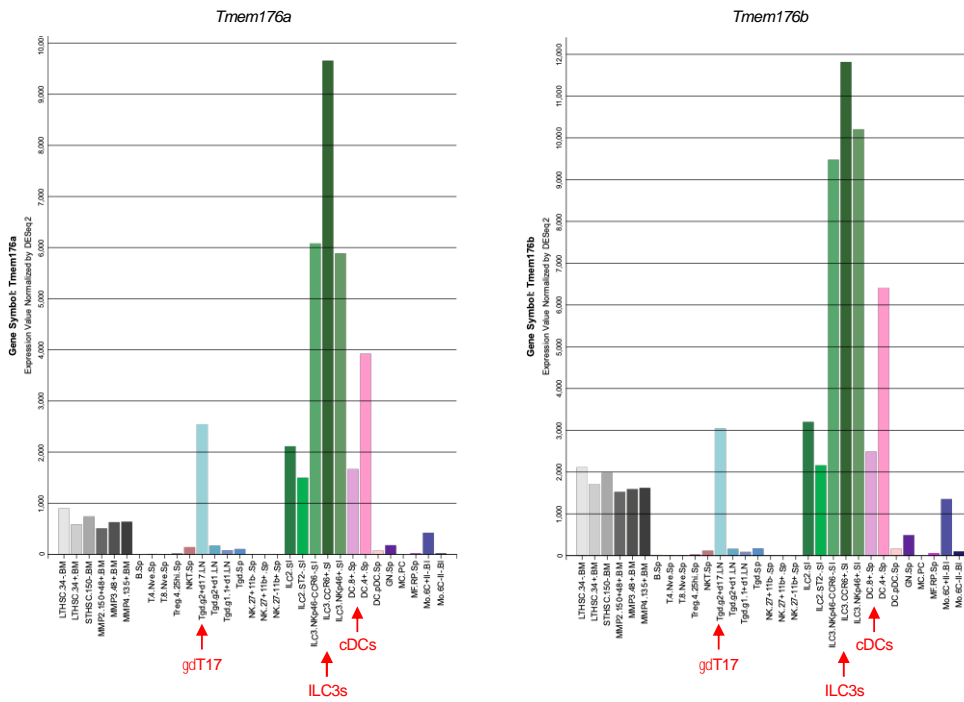
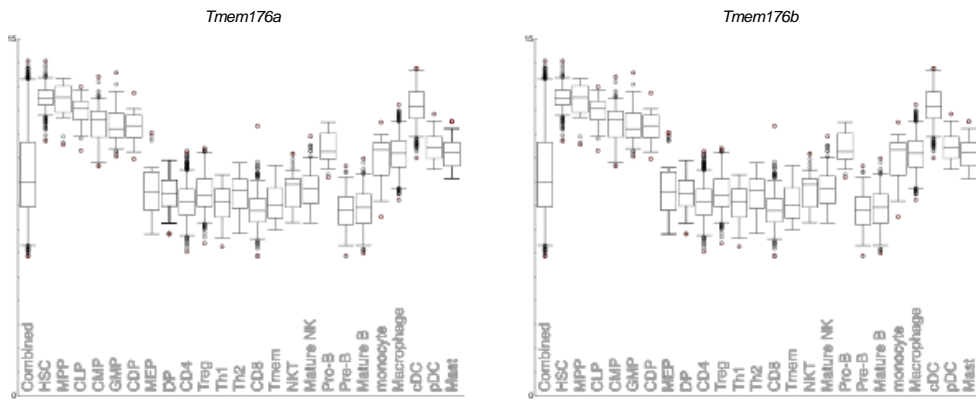


Figure 18 Expression de Tmem176a et b dans les cellules du système immunitaire. Les deux gènes sont plus fortement exprimés dans progéniteurs hématopoïétiques, les cDCs et les cellules RORγt+. Expression issue des bases de données Immunonavigator (microarray data) et Immgen (RNAseq).

3.4. Identification récente de l'expression des homologues dans les cellules RORγt⁺

Récemment des études ont montré que les deux gènes étaient également fortement exprimés dans les cellules de l'immunité de type 17, définie par l'expression du facteur de transcription RORγt et par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-17 et l'IL-22, comme discuté dans la première partie (**Figure 18**). En 2012, l'équipe de Dan Littman s'est intéressée

à comprendre comment était orchestrée la différenciation des Th17 chez la souris, dans le but d'identifier des facteurs critiques (Ciofani *et al.*, 2012). De manière intéressante, les auteurs ont mis en évidence une liste restreinte de onze gènes qui sont dépendants de ROR γ t. Parmi ces onze gènes figurent *Tmem176a* et *b* (Ciofani *et al.*, 2012). Autrement dit, les deux gènes homologues sont des cibles directes de ROR γ t dans l'induction du programme transcriptionnel de la différenciation des Th17.

Le second type cellulaire très connu de la famille ROR γ t est les ILC3. Ces cellules sont particulièrement importantes pour l'homéostasie intestinale et ont un rôle précoce dans la défense contre les infections. L'équipe de Marco Colonna s'est intéressée à améliorer la classification des différentes populations d'ILC et des cellules NK (Robinette *et al.*, 2015). Pour cela, les auteurs ont analysé l'expression génique des ILC isolées, à partir de l'intestin, de la rate et du foie chez la souris. Ils ont mis en évidence que *Tmem176a* et *b* font partie d'une liste de gènes signatures des ILC, ainsi que quinze autres gènes. De plus, ils ont montré que les deux gènes sont plus fortement exprimés dans les ILC3 qui sont le pendant inné des Th17.

Suite à ces résultats d'analyse transcriptionnelle, notre équipe a été la première à montrer la surexpression de *Tmem176a* et *b*, à la fois dans des Th17, des ILC3 et des T γ δ 17 (Drujont *et al.*, 2016).

D'autres types cellulaires font partie de l'immunité de type 17, notamment les iNKT17. Afin de mettre en évidence les différentes sous-populations des iNKT du thymus, une analyse au niveau transcriptomique et épigénétique ainsi qu'une analyse par single cell RNA sequencing ont été réalisées par l'équipe de Mitchell Kronenberg en 2016, comme décrit dans la première partie de cette introduction (Engel *et al.*, 2016). Les auteurs ont démontré que les différentes sous-populations étaient distinctes par l'expression de différents facteurs de transcription et de cytokines, par exemple. Dans cette étude, il a été mis en évidence que *Tmem176a* et *b* sont surexprimés dans les iNKT17 ainsi que d'autres gènes tels que *IL23r* et facteur de transcription *Rorc*. Plus récemment, une étude s'est intéressée à une population de lymphocytes T γ δ du tissu adipeux et produisant l'IL-17A (Kohlgruber *et al.*, 2018). Ces cellules sont capables de réguler une population de lymphocytes T régulateurs et de contrôler la température de l'organisme. Ces cellules ont été caractérisées par leur profil d'expression et *Tmem176a* et *b* apparaissent surexprimés dans cette sous-population de T γ δ produisant l'IL-17a. Une autre étude confirme l'expression de *Tmem176a* et *b* dans les

Ty δ 17. Les cellules Ty δ produisant l'IL-17 présentent une faible diversité de leur répertoire TCR qui est particulièrement enrichi en chaîne V γ 6⁺ et V γ 4⁺. L'équipe de Sarina Ravens a caractérisé ces cellules en single cell RNA seq (Tan *et al.*, 2019). De manière intéressante, les auteurs ont montré que *Tmem176a* et *b* font partie d'une liste de gènes signatures des cellules Ty δ 17 V γ 6⁺ dans le thymus, la peau et les ganglions.

Ainsi, la surexpression des deux gènes n'est pas restreinte aux cDCs mais est également observée dans les différentes populations cellulaires de l'immunité de type 17 caractérisées par l'expression du facteur de transcription ROR γ t.

4. L'expression de *Tmem176a* et *b* est associée à différentes pathologies

4.1. Les pathologies liées au système immunitaire

De nombreuses études portant sur les pathologies s'intéressent à associer des gènes au développement des maladies ou en tant que marqueurs prédictifs de bons ou mauvais pronostics. *Tmem176a* et *b* ont de cette manière été associés à des pathologies d'origine immunitaire.

Un exemple est la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge), qui correspond à la dégradation de la macula, une partie de la rétine, et qui peut conduire à une perte de la vision centrale. Les causes de cette pathologie qui sont multifactorielles n'ont pas encore été établies avec précision. Néanmoins, certains facteurs du complément et des facteurs de l'inflammation pourraient être impliqués. Une accumulation de macrophages est, par exemple, retrouvée au sein des photorécepteurs de la macula. En 2016, une équipe s'est intéressée à l'analyse transcriptomique des monocytes du sang de patients atteints de DMLA (Grunin *et al.*, 2016). De manière intéressante, *TMEM176A* et *B* sont surexprimés dans les monocytes de patients en comparaison à des contrôles. Des travaux plus poussés sont néanmoins nécessaires pour définir plus précisément le rôle que pourraient avoir ces gènes dans le développement de la pathologie.

L'expression de *TMEM176A* et *B* a également été mise en évidence dans le sang de patients atteints de sclérose en plaques (Nickles *et al.*, 2013). Les causes de la sclérose en plaques ne sont pas bien comprises à l'heure actuelle. Néanmoins, l'implication de cellules du système immunitaire est reconnue. Cette étude ne se focalisait pas sur une population sanguine particulière, il est donc impossible d'attribuer cette surexpression dans la sclérose en plaques à des cellules myéloïdes ou à des cellules ROR γ t⁺ toutes deux pouvant participer

directement au développement de cette pathologie auto-immune dans laquelle la réponse T est cruciale.

Un autre exemple est la maladie de Ménière. Il s'agit d'une pathologie chronique, touchant l'oreille interne et provoquant des vertiges, des acouphènes et une perte de l'audition. Encore une fois, les causes ne sont pas connues mais une hypothèse proposée serait l'existence de mécanismes auto-immuns. En analysant les cellules mononuclées du sang de patients atteints de la maladie de Ménière, il a été mis en évidence une surexpression *TMEM176A* et *B* chez les patients en comparaison aux volontaires sains (Sun *et al.*, 2018).

4.2. Les cancers

Plusieurs études ont mis en évidence une association de *TMEM176A* et *B* dans les cancers, seulement en terme d'expression dans la majorité des cas. Par exemple, une équipe s'est intéressée à mesurer leur expression dans différents tissus sains et des biopsies de cancers. Il a été montré que les deux gènes sont surexprimés dans les cancers lymphoïdes (Cuajungco *et al.*, 2012). De plus, *TMEM176A* est plus fortement exprimé dans les cancers du poumon en comparaison à un tissu sain (Cuajungco *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2017).

Deux groupes ont étudié plus en détails le rôle de *TMEM176A* dans les cancers. En 2017, le groupe de Guoling Liao a confirmé la surexpression de *TMEM176A* dans le cancer du poumon. Il a été montré que l'inhibition du gène entraînait une augmentation du nombre de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et plus de cellules en apoptose. Ces résultats suggèrent que la surexpression de *TMEM176A* serait associée à la prolifération des cellules tumorales pulmonaires. A l'inverse, trois études du groupe de Mingzhou Guo ont associé la méthylation du gène *TMEM176A*, et donc la diminution de son expression, à la différenciation des cellules tumorales et au développement de métastases dans trois types de cancers : colorectal, de l'œsophage et du foie (Gao *et al.*, 2017; Ying Wang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). Dans le cancer de l'œsophage, la méthylation de *TMEM176A* est significativement associée à une moins bonne survie à cinq ans. En utilisant les trois types de cellules tumorales, les auteurs ont mis en évidence que la surexpression de *TMEM176A* induit l'apoptose, inhibe la migration et l'invasion des cellules tumorales et inhibe la pousse tumorale *in vitro* et *in vivo*.

De plus, la surexpression *TMEM176A* a été associée au carcinome rénal (Otsubo *et al.*, 2014) alors qu'une expression diminuée a été montrée dans le carcinome hépatocellulaire (Hodo

et al., 2010). Enfin, l'augmentation de l'expression des deux gènes a été mise en évidence dans le glioblastome et les cancers gastriques (Liu *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018).

Les cancers sont des pathologies hétérogènes ; dans certains types, l'expression de *TMEM176A* et *B* est augmentée, dans d'autres, elle est diminuée. Il est donc difficile de conclure sur leur rôle dans les cancers. Par contre, il est évident que comprendre leur fonction pourrait mettre en évidence leur implication dans les pathologies auxquelles ils ont été associés.

5. TMEM176B est un canal ionique impliqué dans des cellules dendritiques tolérogènes dérivées *in vitro*

A la suite de l'identification de *Tmem176b* dans un modèle d'allogreffe, notre équipe a voulu comprendre son rôle en générant une souris déficiente (Segovia *et al.*, 2014).

De manière intéressante, un rôle de *Tmem176b* a été mis en évidence pour la première fois dans des cellules myéloïdes, plus précisément dans des DCs tolérogènes nommées ATDC (autologous tolerogenic dendritic cell). Les ATDC murines sont différenciées *in vitro* à partir de la moelle osseuse. Contrairement aux BMDC classiques, les ATDC sont dérivées en présence de faibles quantités de GM-CSF (Segovia *et al.*, 2010). Ces conditions de différenciation induisent un phénotype très particulier à la frontière entre les DCs et les macrophages et leur confèrent leurs propriétés tolérogéniques. Ces propriétés ont été décrites dans plusieurs modèles de transplantation chez la souris, le rat et le macaque (Bériou *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2009; Baas *et al.*, 2014). Ces cellules sont en cours d'étude par notre équipe afin de caractériser plus précisément leur phénotype et leurs mécanismes suppresseurs.

Chez la souris, le transfert de ces ATDC combiné à un traitement anticorps anti-CD3 prolonge efficacement la survie d'une allogreffe de peau dans un modèle mâle sur femelle (antigènes mineurs mâles) (Segovia *et al.*, 2014). De manière intéressante, lorsque les ATDC sont différenciées à partir de souris déficientes pour *Tmem176b*, elles perdent leur capacité à prolonger la survie du greffon (Segovia *et al.*, 2014). Des analyses phénotypiques des cellules ATDC contrôles et KO n'ont pas mis en évidence de différences. Par contre, il a été montré que les ATDC KO sont moins aptes à induire la prolifération de cellules T CD8⁺ OT-1 en présence de la protéine OVA. De manière intéressante, notre équipe a montré que le pH des phagosomes des ATDC déficientes pour *Tmem176b* est plus alcalin que celui des ATDC

contrôles. Ce résultat est renforcé par une étude ayant suggéré que TMEM176B pourrait être localisée dans la membrane des phagosomes (Shui *et al.*, 2008). La dégradation des antigènes nécessite une acidification du pH progressive et finement régulée. L'altération du pH des phagosomes a conduit notre équipe à réaliser des études d'électrophysiologie. L'expression de la protéine à la surface des oocytes de *Xenopus* a mis en évidence que TMEM176B serait un canal à cation non sélectif, permettant le passage des ions K^+ et Na^+ et qu'il serait sensible à l'acidité. Ainsi, les ATDC sont moins capables de contrôler un pH optimal pour la cross-présentation en absence de *Tmem176b*. Ce canal permettrait l'acidification optimale du phagosome pour la dégradation des antigènes. Il permettrait la sortie de cations nécessaire à l'entrée de proton H^+ induisant l'acidification du compartiment (Figure 19).

Cette fonction de régulation de la cross-présentation a été mise en évidence dans un modèle de DCs tolérogènes dérivées *in vitro*. Néanmoins, ces cellules sont très éloignées des cDCs. Ainsi, le rôle de *Tmem176b* n'a pas été étudié dans des cDCs.

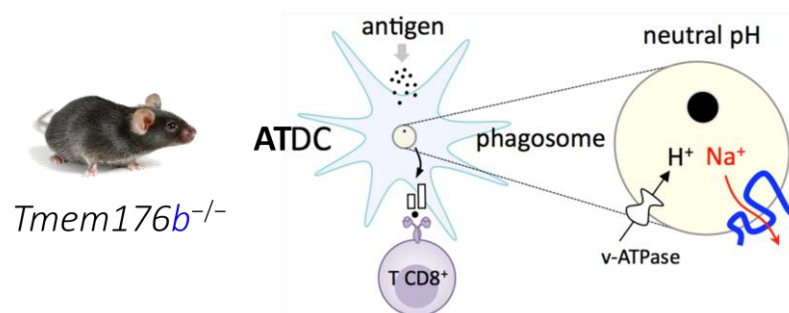


Figure 19 TMEM176B est un canal ionique intracellulaire impliqué dans la régulation du pH phagosomal dans les DCs tolérogènes dérivées *in vitro* (ATDC). (Figure réalisée selon Segovia *et al.* American Journal of Transplantation. 2014).

6. Etude du rôle de *Tmem176b* dans les cellules ROR γ ⁺

La mise en évidence de l'expression de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺ a conduit notre équipe à étudier leur rôle dans ce compartiment cellulaire (Drujont *et al.*, 2016). Dans un premier temps, la surexpression de *Tmem176a* et *b* a été confirmée en qPCR et publiée pour la première fois dans les Th17 et les ILC3, chez la souris et également chez l'homme pour les Th17 (Drujont *et al.*, 2016) (Figure 20).

Ensuite, afin de comprendre le rôle de *Tmem176b*, différents modèles de pathologies impliquant les cellules de l'immunité de type 17 ont été réalisés chez la souris déficiente

pour *Tmem176b* (Drujont *et al.*, 2016). Ces cellules ont un rôle particulièrement important dans l'intestin comme je l'ai décrit dans la première partie de l'introduction. Un modèle très utilisé pour étudier ces cellules est donc la colite. En effet, différentes méthodes permettent d'induire une perturbation dans l'équilibre intestinal, telle qu'une atteinte de la barrière épithéliale. Cette perturbation va nécessiter une augmentation de la fonction des cellules ROR γ ⁺ pour la réparation. De cette manière, il pourra être mis en évidence, aussi bien une amélioration qu'une altération de la fonction des cellules ROR γ ⁺. Un des modèles qui a été utilisé par notre équipe consiste à induire une colite chimique aigüe au DSS. Le DSS est dilué dans l'eau de boisson et provoque une atteinte de la barrière intestinale qui conduit à une translocation bactérienne et à une inflammation. Dans ce modèle, les ILC3 jouent un rôle crucial dans la réparation de l'épithélium en sécrétant l'IL-22. En comparant des souris contrôles et des souris déficientes pour *Tmem176b*, aucune différence n'a été observée lors de la phase d'induction de la pathologie ou lors de la phase de réparation de l'épithélium (Drujont *et al.*, 2016). Donc, dans ce modèle, l'absence de *Tmem176b* ne semble pas avoir d'impact sur la capacité de réparation des cellules ROR γ ⁺.

Les cellules de l'immunité de type 17 ont également un rôle pathogénique. Bien que leur rôle soit encore incertain, les Th17 semblent être importantes dans l'induction du modèle d'EAE. Cependant, les souris déficientes pour *Tmem176b* développent une pathologie similaire aux souris contrôles (Drujont *et al.*, 2016). Ainsi, *Tmem176b* ne serait ni impliqué dans la pathogénicité de ce modèle, ni dans la protection contre l'EAE. Contrairement à la sclérose en plaques, les cellules ROR γ ⁺ ont clairement été impliquées dans le psoriasis. Chez la souris, le modèle de dermatite induit par l'imiquimod (crème Aldara™) mime les symptômes du psoriasis. Dans ce modèle, les cellules $\gamma\delta$ 17 et les ILC3 sont la principale source d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22 pathogéniques. De manière intéressante, les souris déficientes présentent significativement moins de symptômes en terme d'érythème et de dessèchement de la peau, bien que les différences avec les souris contrôles soient relativement faibles (Drujont *et al.*, 2016). De plus, les niveaux d'expression des cytokines IL-17A, IL-17F et IL-22 de la peau, mesurés en qPCR sont moins élevés chez les animaux déficients. Ainsi, l'absence de *Tmem176b* serait protectrice dans ce modèle, ce qui suggère un rôle fonctionnel dans les cellules de l'immunité de type 17.

En conclusion, plusieurs modèles ciblant les cellules ROR γ ⁺ ont été réalisés. Néanmoins, peu ou pas de différences ont été observées en comparaison avec les animaux contrôles. Ces

résultats ont été générés chez la souris déficiente pour *Tmem176b*, mais son homologue *Tmem176a* étant exprimé, il pourrait partiellement compenser l'absence du *b*.

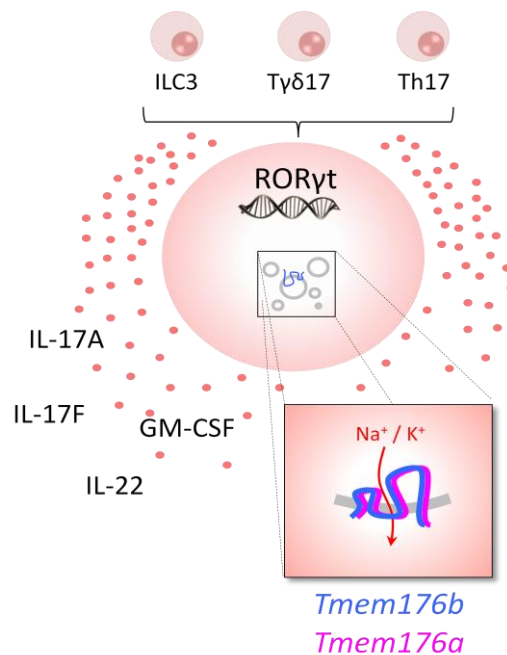


Figure 20 Notre équipe a confirmé la forte expression de *Tmem176a* et *b* dans les cellules de la famille RORγt en comparaison aux autres différenciations. Cette surexpression n'a pas encore été associée à une fonction dans ces cellules (Figure réalisée selon Drujont et al. *Scientific reports*. 2016).

7. Rôle de *Tmem176b* dans l'inflammasome

Récemment, une étude a suggéré un rôle de *Tmem176b* dans la réponse T CD8⁺ anti-tumorale en participant à la régulation de l'inflammasome (Segovia *et al.*, 2019). NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) est un récepteur qui, après activation, induit l'assemblage de l'inflammasome dit inflammasome NLRP3. Cet assemblage active la voie de la Caspase 1 dont le résultat est la production des cytokines IL-1β et IL-18. L'ATP couplé à une activation au LPS est un inducteur de l'inflammasome NLRP3. Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'en absence de *Tmem176b*, les BMDC stimulées par de l'ATP et du LPS sécrètent plus d'IL-1β et d'IL-18 que des BMDC contrôles. Pour confirmer le rôle de l'inflammasome dans la sécrétion des cytokines, les auteurs ont utilisé des BMDC issues de souris déficientes à la fois pour *Tmem176b* et pour la *Caspase1*. De manière intéressante, ces cellules ne sécrètent pas ou peu de cytokines. De plus, il a été mis en évidence que l'injection d'ATP chez des souris déficientes pour *Tmem176b* induit un recrutement des neutrophiles dans la cavité péritonéale plus important que chez des souris contrôles. De

manière intéressante, chez les animaux *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-}, le recrutement des neutrophiles est nettement moins important. Ainsi, l'absence de *Tmem176b* permettrait une activation plus forte de la voie de la Caspase 1. Il est intéressant de noter que l'inflammasome est finement régulé par le potassium et le calcium cytosolique, notamment, par les canaux potassiques activés par le calcium (Ca²⁺-activated K⁺ channel). Précédemment, il a été mis en évidence que TMEM176B serait un canal ionique permettant le passage d'ions K⁺ et Na⁺ (Segovia *et al.*, 2014). Une augmentation du calcium intracellulaire a été mise en évidence dans les BMDC KO stimulées par de l'ATP. Ainsi, les auteurs suggèrent que TMEM176B empêcherait l'accumulation de Ca²⁺ dans le cytosol après une stimulation par l'ATP et préviendrait l'activation de l'inflammasome par les canaux potassiques dépendants du calcium. Pour comprendre l'impact de l'absence de *Tmem176b* sur les réponses immunitaires liées à l'inflammasome les auteurs se sont intéressés à la réponse anti-tumorale. Ils ont montré que dans trois modèles différents de tumeur, les souris déficientes pour *Tmem176b* survivent mieux que les animaux contrôles. A l'inverse, les souris déficientes pour *Tmem176b* et la *Caspase1* présentent une survie similaire aux animaux contrôles. Ainsi, l'augmentation de la survie des souris KO serait dépendante de l'activation de l'inflammasome. De plus, l'inhibition de TMEM176B combiné à un traitement anti-CTLA-4 induit une meilleure survie des animaux. Ainsi, les auteurs ont proposé que TMEM176B pourrait avoir un rôle inhibiteur de l'inflammasome et pourrait être bloqué pour améliorer la réponse anti-tumorale en combinaison avec un traitement anti-PD-1 ou anti-CTLA-4.

Néanmoins, cette étude s'est focalisée sur TMEM176B seul, il serait intéressant de montrer si ces résultats sont reproduits chez les souris déficientes pour TMEM176A et B. De plus, ces expériences ont été réalisées avec des BMDC générées en présence de faibles quantités de GM-CSF, de manière similaire aux ATDC. Il serait donc intéressant de confirmer ces résultats avec des BMDC générées dans des conditions classiques ou directement avec des DCs isolées de la rate.

8. Localisation intracellulaire de TMEM176A et B

En parallèle des études fonctionnelles réalisées par notre équipe sur *Tmem176a* et *b*, des études de localisation intracellulaire ont également été menées. En effet, la mise en évidence de la localisation des canaux ioniques pourrait apporter des indications sur leur

rôle. Initialement TMEM176A et TMEM176B ont été localisées à la membrane des phagosomes (Shui *et al.*, 2008; Segovia *et al.*, 2014). L'équipe de Carolyn Bertozzi a réalisé une analyse des protéines présentes dans la membrane des phagosomes des macrophages (Shui *et al.*, 2008). Parmi les 546 protéines mises en évidence, TMEM176A et B ont été identifiées.

Plus récemment, des analyses en immunofluorescence réalisées par notre équipe ont mis en évidence que TMEM176A et B sont colocalisées (Drujont *et al.*, 2016). Pour mieux définir le compartiment cellulaire contenant ces protéines, la localisation de TMEM176B a été analysée en réalisant des co-marquages dans des cellules Th17 humaines (Drujont *et al.*, 2016). Il a été montré que le canal ionique est associé au marqueur GM130 qui est spécifique de l'appareil de Golgi. Cependant, en séparant les différents constituants de l'appareil de Golgi grâce au nocodazole, TMEM176B a plutôt été associée au réseau trans-Golgien (« trans-Golgi network », TGN). Ainsi, les deux protéines pourraient se concentrer dans une structure vésiculaire fortement associée au trans-Golgi network. Ces résultats ont été obtenus en utilisant un anticorps anti-TMEM176B. Selon la sensibilité de cet anticorps, il est possible qu'il ne détecte la protéine seulement quand elle est fortement concentrée. D'autres études plus fines seraient nécessaires pour conclure sur la localisation des protéines, ce qui représentera une partie de mon travail de thèse.

9. Génération d'une souris déficiente pour *Tmem176a* et *Tmem176b*

Tmem176a et *b* sont deux gènes homologues qui présentent une structure protéique très similaire (Louvét *et al.*, 2005). L'expression de chacune de ces protéines dans des ovocytes de *Xenopus* a mis en évidence leur capacité respective à induire un courant ionique similaire après acidification du milieu extérieur (pH=5) (Drujont *et al.*, 2016). De manière intéressante, il a été mis en évidence une surexpression de *Tmem176a* chez la souris déficiente pour *Tmem176b* (Drujont *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que TMEM176A et B ont une fonction commune et qu'ils se compensent mutuellement en l'absence de l'un des deux gènes. Autrement dit, le phénotype observé chez la souris déficiente pour *Tmem176b* ne pourrait être que partiel car compensé par *Tmem176a*. Afin de mettre en évidence le rôle de ces deux protéines, il a été nécessaire de générer une souris double KO (DKO) c'est-à-dire déficiente pour les deux gènes. Deux souris DKO ont été générées.

La première est une souris DKO totale, générée dans un premier temps dans un fond génétique mélangé C57BL/6/DBA2 puis dans un second temps dans un fond génétique pur C57BL/6(N). Ces souris ont été générées en utilisant la méthode du CRISPR-Cas9, directement dans des embryons au stade une cellule (Lemoine *et al.*, 2016). La souris, en fond mélangé, a été générée au début de la mise en place de la technique du CRISPR-Cas9. Il y avait donc peu de recul sur la technique et, dans le but d'augmenter les chances de réussite, il a été fait le choix du fond mélangé. Les souris ont par la suite été croisées avec des souris C57BL/6 (« backcross ») pour obtenir à terme des souris avec un fond génétique provenant au maximum de cette lignée. Malgré ces backcross, le fond génétique n'étant pas pur, les différences observées avec des animaux contrôles ne peuvent pas être attribuées seulement aux gènes délétés mais peuvent également venir de « résidus » du fond DBA2. C'est pourquoi, l'équipe a généré une souris DKO, cette fois-ci directement en fond génétique C57BL/6.

Pour générer cette souris déficiente, l'équipe a conçu des séquences (sgRNA) pour cibler spécifiquement le premier exon de chacun des deux gènes. Après la coupure par la protéine Cas9, la cellule va essayer de réparer l'ADN grâce au système NHEJ (non-homologous end-joining). Lors de cette réparation différents événements peuvent se produire tels que l'insertion d'un codon stop qui arrêtera la transcription ou une inversion des séquences qui générera la production d'une protéine non fonctionnelle. Dans le cas de la souris double déficiente pour *Tmem176a* et *b*, la séquence génique située entre les deux sgRNA a été délétée et aucun des gènes n'est transcrit. *Tmem176a* et *b* ne sont donc exprimés dans aucune des cellules de cette souris DKO (**Figure 21**).

Pour générer des animaux utilisés lors des expériences, des souris hétérozygotes sont accouplées entre elles afin de générer des animaux contrôles et DKO issus des mêmes parents et hébergés dans la même cage.

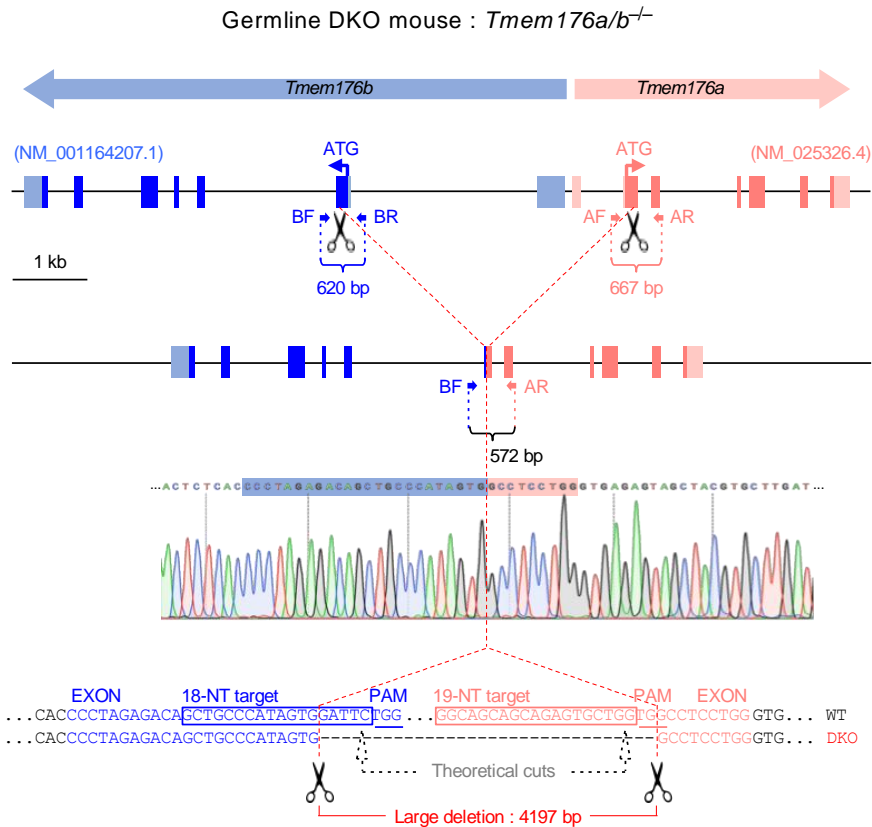


Figure 21 Génération des souris *Tmem176a/b* double KO (DKO) totale portant une délétion importante en utilisant une double stratégie CRISPR-Cas9. Les petites flèches marquées BR, BR, AF et AR montrent la position des amorces utilisées pour le génotypage par PCR des souris mutantes. Les exons sont représentés par des cases remplies et les régions non traduites par des cases ombrées.

En parallèle, une seconde souris DKO a été générée. Il s'agit d'une souris DKO conditionnelle. Cette souris a été générée pour deux raisons. Dans la souris DKO totale, dans le cas d'un phénotype trop fort qui pourrait être léthal, la souris DKO conditionnelle permettrait de délétér les gènes seulement à l'état adulte. De plus, il est aussi possible de délétér les gènes seulement dans une population cellulaire afin de pouvoir attribuer un phénotype à un type cellulaire. Ces souris conditionnelles qui portent un allèle *Tmem176a/b* «floxed» (*Tmem176a/b*^{*fl*}) ont été générées par l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France). En bref, deux séries consécutives de modifications de cellules ES, en utilisant deux cassettes de sélection indépendantes, ont été réalisées pour insérer des sites *LoxP* des deux côtés des premiers exons codants pour *Tmem176a* et *Tmem176b*. La transmission des allèles a été vérifiée dans les souris F1 (**Figure 22**).

Tmem176a et *b* sont fortement exprimés à la fois dans les DCs et dans les cellules RORγt⁺. Afin de pouvoir attribuer un phénotype à un type cellulaire, nous avons croisé les souris conditionnelles avec des souris exprimant la recombinaison Cre, soit dans les DCs (*CD11c-Cre*),

soit dans les cellules ROR γ t⁺ (*Rorc*-Cre), afin de déléter les deux gènes seulement dans un type cellulaire. Des souris hétérozygotes *Tmem176a/b*^{fl/wt} ont été croisées avec des souris *Rorc*(γ t)-Cre (générées par Gérard Eberl) (Lochner *et al.*, 2008) et fournies par Bernhard Ryffel) ou *CD11c*-Cre (*Itgax*-Cre, générées par Boris Reizis (Caton, Smith-Raska et Reizis, 2007) et fournies par Véronique Godot). Après des croisements successifs, les « littermates » homozygotes *Tmem176a/b*^{fl/fl} co-hébergés, appariés par sexe et par âge et portant un allèle Cre transgénique ou non ont été appariés pour des expériences.

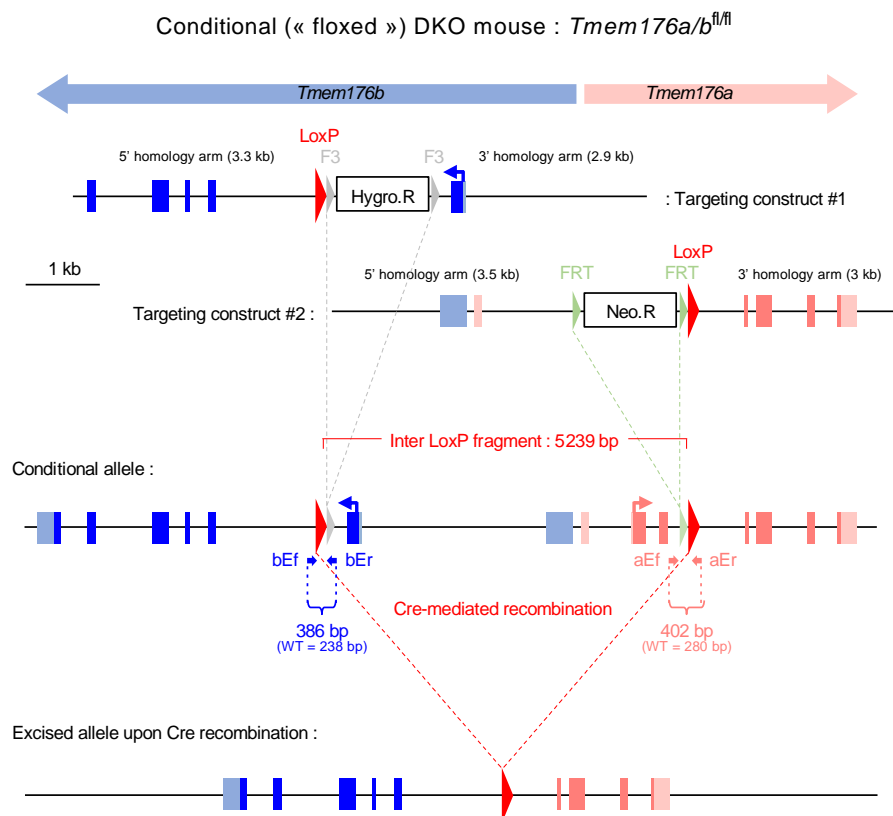


Figure 22 Génération des souris *Tmem176a/b* DKO conditionnelles. Les petites flèches marquées bEf, bEr, aEf et aEr indiquent la position des amorces utilisées pour le génotypage par PCR des souris mutantes.

D. Quel est le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺ et les cellules dendritiques ?

Tmem176a et *b* sont deux gènes homologues dont l'expression est très probablement co-régulée et est répartie de manière très similaire au niveau tissulaire et cellulaire. Ces protéines ont également une fonction commune de canal ionique non sélectif, activé par l'acidité. De manière surprenante, ces gènes sont exprimés à un niveau basal dans plusieurs types cellulaires et très fortement dans deux types cellulaires particuliers. Cette expression suggère que les deux protéines pourraient avoir un rôle universel qui s'adapterait en fonction du besoin et de la spécificité fonctionnelle de la cellule.

Initialement, notre équipe a mis en évidence que *Tmem176a* et *b* sont fortement exprimés dans les cDCs (Louvet *et al.*, 2005). Des études d'autres groupes ont par la suite confirmé cette expression préférentielle des deux homologues. De manière surprenante, malgré cette forte expression, aucune étude n'a été réalisée sur la fonction de ces deux protéines dans les cDCs. Nous nous sommes demandé si la forte expression de *Tmem176a* et *b* dans les DCs pouvait être liée à la spécificité fonctionnelle de ces cellules. En effet, ces cellules ont un rôle crucial dans la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T. Ainsi, nous avons posé l'hypothèse que *Tmem176a* et *b* pourraient être impliqués dans l'activation des lymphocytes T. De nombreux mécanismes intracellulaires pouvant impliquer *Tmem176a* et *b* sont regroupés dans cette fonction, que ce soit l'apprêtement des antigènes, la captation de signaux de danger ou la sécrétion de cytokines, par exemple.

En parallèle, *Tmem176a* et *b* sont également fortement exprimés dans les cellules ROR γ ⁺. Cette expression a été identifiée pour la première fois par l'équipe de Dan Littman (Ciofani *et al.*, 2012). La description du réseau transcriptionnel des Th17 a conduit à l'identification de onze cibles directes de ROR γ parmi lesquelles des gènes largement étudiés comme *Il17a*, *Il17f* ou *Il23r* mais aussi cinq nouvelles cibles qui, de façon inattendue, incluaient *Tmem176a* et *b*. En réalisant des différenciations *in vitro* de cellules T CD4⁺ notre équipe a ensuite mis en évidence une expression quasiment exclusive de ces deux gènes dans les cellules Th17 en comparaison aux autres polarisations testées (Th1, Th2 et Treg). Puis cette expression préférentielle s'est étendue à l'ensemble des cellules ROR γ ⁺. De ces résultats découle l'hypothèse selon laquelle *Tmem176a* et *b* pourraient jouer un rôle fondamental dans la biologie des cellules ROR γ ⁺ et dans l'immunité de type 17. En étudiant la souris

déficiente pour *Tmem176b*, notre équipe n'a pas mis en évidence de rôle majeur de ce gène dans les cellules ROR γ t⁺ (Drujont *et al.*, 2016). Néanmoins, dans cette souris, il a été montré une surexpression de son homologue suggérant une compensation fonctionnelle et donc un phénotype partielle.

Pour comprendre comment ces deux canaux ioniques peuvent être exprimés aussi fortement dans deux types cellulaires très distincts, des souris déficientes (totales et conditionnelles) pour les deux gènes ont été générées. Ces outils indispensables, nous ont permis d'investiguer l'impact de l'absence de *Tmem176a* et *b*.

En parallèle de ces hypothèses que nous avons au début de ce travail de thèse, nous nous sommes interrogés sur la localisation intracellulaire de *Tmem176a* et *b*, en présumant que cette localisation pourrait fournir des informations sur leur rôle. Pour cela, au cours de mon master 2, j'ai développé au laboratoire une technique d'imagerie intracellulaire en temps réel, nommée RUSH (Boncompain *et al.*, 2012). En collaboration avec l'équipe de Franck Perez à l'origine de cette technique, nous avons mis en évidence que *Tmem176a* et *b* sont localisées dans des vésicules dynamiques bien au-delà du *trans*-Golgi Network. Ainsi, nous nous sommes interrogés sur la nature de ces vésicules et sur le lien entre ces vésicules et la fonction des canaux ioniques.

Au début de ce travail de thèse nous avons donc trois principales questions (**Figure 23**) :

Quel est le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ t⁺ et peuvent-ils être impliqués dans la protection tissulaire associée à l'immunité de type 17 ?

Quel est leur rôle dans les DCs dont la fonction majeure est la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T naïfs?

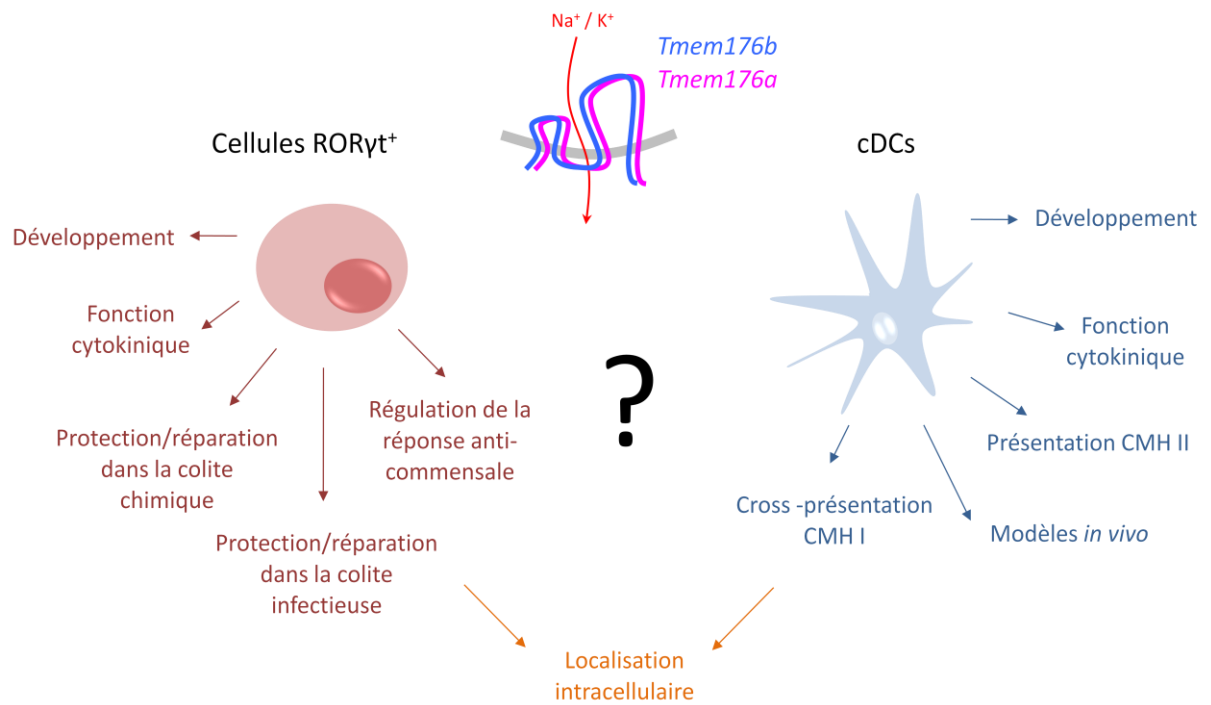


Figure 23 Ce projet de thèse s'est organisé autour de trois grands axes : l'étude du rôle *Tmem176a* et *b* dans les cellules *RORγt*⁺, l'étude de leur rôle dans les DCs et l'analyse de leur localisation intracellulaire.

Résultats

A. Etude du rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺ : résultats préliminaires

A la suite des travaux réalisés sur la souris déficiente pour *Tmem176b* (Drujont *et al.*, 2016), j'ai travaillé sur la souris DKO générée dans un fond génétique mélangé (C57BL/6/DBA2) (Lemoine *et al.*, 2016) afin d'étudier le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺. Ces animaux ont été croisés avec des souris C57BL/6 pour se rapprocher le plus possible de ce fond génétique. Quand j'ai étudié ces animaux, cinq croisements (backcross) avaient été réalisés. A ce stade de croisement, les souris possèdent théoriquement à 97% un fond génétique C57BL/6.

Pour comprendre le rôle des gènes homologues dans les cellules ROR γ ⁺, nous avons utilisé le modèle de colite aiguë induite par le DSS. Ce modèle, comme je l'ai décrit dans l'introduction, provoque des lésions tissulaires et une perméabilité de la muqueuse intestinale. Le DSS est administré dans l'eau de boisson des souris, à 2% pendant sept jours. Dans ce modèle, l'IL-22, principalement produit rapidement par les ILC3s, est majeur pour la récupération et la réparation d'une fonction intestinale normale après l'arrêt du traitement (Sugimoto *et al.*, 2008).

L'impact de la colite est mesuré par la perte de poids des souris et par un score des fécès. De manière intéressante, et contrairement aux souris déficientes pour *Tmem176b* (Drujont *et al.*, 2016), les souris DKO présentent des symptômes exacerbés (**Figure 24**). En effet, les souris DKO perdent significativement plus de poids que les souris contrôles. En plus de cette perte de poids, le score des fécès est plus élevé chez les souris DKO, confirmant l'exacerbation des symptômes. En répétant les expériences, nous avons mis en évidence une diminution de la survie des souris DKO en comparaison aux souris contrôles. Ainsi, l'absence de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺ compromettrait leur capacité protectrice au cours d'une inflammation.

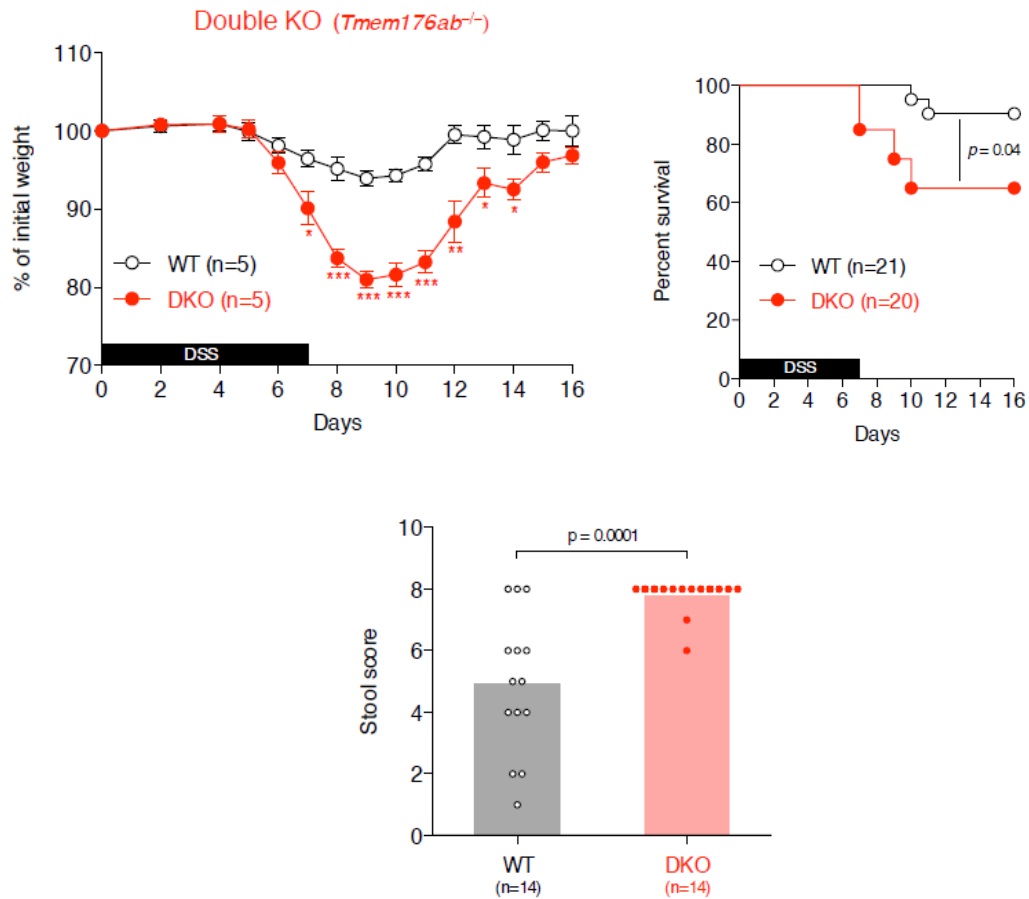


Figure 24 Exacerbation de la colite induite au DSS chez les animaux DKO. Les animaux sont traités avec 2% de DSS dans l'eau de boisson pendant 7 jours. Ce modèle est monitoré par la perte de poids et le score des fécès. Les souris DKO présentent une perte de poids significativement plus importante, un score des fécès significativement plus élevé à jour 7 et une survie inférieure.

Bien que les croisements avec les souris C57BL/6 nous aient permis d'atteindre 97% de fond génétique pur, il est impossible d'exclure que l'exacerbation de la colite soit uniquement due à l'absence de *Tmem176a* et *b* (Chilsom *et al.*, 2019). De plus, le fond génétique de souris influence fortement la composition de la flore intestinale; de cette variabilité du microbiote résulte une sensibilité plus ou moins forte des animaux face au traitement DSS. Ainsi, pour attribuer ce phénotype à *Tmem176a* et *b* il était nécessaire de confirmer ces résultats prometteurs en utilisant les souris DKO génétiquement pures, générées en parallèle. Cependant, nous n'avons pas reproduit cette exacerbation des symptômes dans les souris DKO pures (résultats inclus dans l'article suivant). Je reviendrai sur ces résultats dans la discussion.

B. Article : Dendritic cells require TMEM176A/B ion channel for optimal MHC II antigen presentation to naive CD4⁺ T cells

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de *Tmem176a* et *b* à la fois dans les cellules ROR γ t⁺ et dans les DCs, deux types cellulaires dans lesquels ils sont fortement exprimés. Pour cela, nous avons utilisé pour la première fois des souris déficientes pour les deux gènes. Afin d'attribuer un phénotype à un type cellulaire, nous avons également utilisé des souris déficientes pour *Tmem176a* et *b* seulement dans les cellules ROR γ t⁺ ou seulement dans les DCs (cellules CD11c⁺). De manière intéressante, TMEM176A et B ne semblent pas avoir un rôle majeur dans la fonction protectrice des Th17 et des ILC3. A l'inverse, nous avons montré que ces canaux ioniques sont nécessaires pour une présentation antigénique optimale par la voie du CMH de classe II aux lymphocytes T CD4⁺. En parallèle, l'utilisation d'une technique d'imagerie en temps réel a mis en évidence une localisation préférentielle de TMEM176A et B dans des vésicules de la voie endo-lysosomale. De manière intéressante, nous avons observé une forte colocalisation des homologues avec HLA-DM, une molécule localisée dans le compartiment d'apprêtement des antigènes de la voie du CMH de classe II (MIIC). Ainsi, les canaux ioniques TMEM176A et B seraient impliqués dans la régulation de la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ et auraient un rôle directement dans le compartiment MIIC.

Cet article a été soumis dans Nature Communications

Dendritic cells require TMEM176A/B ion channels for optimal MHC II antigen presentation to naive CD4⁺ T cells

Melanie Lancien¹, Geraldine Bienvenu¹, Lucile Gueno¹, Sonia Salle¹, Emmanuel Merieau¹,
Severine Remy¹, Amandine Even¹, Aurelie Moreau¹, Alice Molle¹, Cynthia Fourgeux¹, Flora
Coulon¹, Gaelle Beriou¹, Laurence Bouchet-Delbos¹, Elise Chiffolleau¹, Peggy Kirstetter²,
Susan Chan², Steven Kerfoot³, Saeed Abdu Rahiman⁴, Veronica De Simone⁴, Gianluca
Matteoli⁴, Gaelle Boncompain⁵, Franck Perez⁵, Regis Josien¹, Jeremie Poschmann¹, Maria
Cristina Cuturi^{1,6}, Cedric Louvet^{1,6,*}

¹ Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et
Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France

² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U1258,
CNRS UMR 7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France

³ Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London,
Ontario N6A 5C1, Canada

⁴ Department of Chronic Diseases, Metabolism and Ageing, Translational Research Center
for Gastrointestinal Disorders (TARGID), University of Leuven, Leuven, Belgium

⁵ Dynamics of Intracellular Organization Laboratory, Institut Curie, PSL Research University,
Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 144, Paris, France

⁶ These authors contributed equally

* Corresponding author

Abstract

Intracellular ion fluxes emerge as critical actors of immunoregulation but still remain poorly explored. Here we investigated the role of the redundant cation channels TMEM176A and TMEM176B (TMEM176A/B) in ROR γ ⁺ cells and conventional dendritic cells (cDCs) using germline and conditional double knock-out (DKO) mice. While *Tmem176a/b* appeared surprisingly dispensable for the protective function of Th17 and group 3 innate lymphoid cells (ILC3s) in the intestinal mucosa, we found that they were required in cDCs for optimal antigen processing and presentation to CD4⁺ T cells. Using a real-time imaging method, we show that TMEM176A/B accumulate in dynamic post-Golgi vesicles preferentially linked to the late endolysosomal system and strongly colocalize with HLA-DM. Together, our results suggest that TMEM176A/B ion channels play a direct role in the MHC II compartment (MIIC) of DCs for the fine regulation of antigen presentation and naive CD4⁺ T cell priming.

Introduction

Multiple ion channels and transporters are expressed in both innate and adaptive immune cells to control various vital functions, from membrane potential regulation to receptor signaling or migration¹. The role of ion flux has notably been fully appreciated following the molecular characterization of the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) through Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels mediated by the ORAI/STIM complex, best characterized in T cells. However, this system appears dispensable for key functions of macrophages and dendritic cells (DCs) while Ca^{2+} signaling remains critical in these cells^{2,3}. This observation points to the importance of alternative systems, yet to be discovered, that regulate the intracellular and luminal concentrations of Ca^{2+} but also other ions including Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} or Zn^{2+} for the control of immune responses. In comparison with the plasma membrane, there is still a paucity of studies investigating the role of intracellular ion channels and transporters, notably in DCs⁴, that could provide major insights into the understanding of new immunomodulatory mechanisms.

We previously showed that the co-regulated genes *Tmem176a* and *Tmem176b* encode redundant acid-sensitive, non-selective, cation channels^{5,6} whose precise functions remain largely unknown in vivo. Transcriptomic, SNP or epigenetic analysis have associated these homolog genes with different pathologies such as multiple sclerosis⁷, chronic obstructive pulmonary disease (COPD)⁸ or age-related macular degeneration (AMD)⁹. These findings suggest an important role of *Tmem176a/b* in the development of inflammatory diseases thus emphasizing the need to identify the immune cell types and the functions in which they are predominantly involved.

We initially cloned *Tmem176b* (originally named *Torid*) as an over-expressed gene encoding an intracellular four-span transmembrane protein in myeloid cells infiltrating non-rejecting allografts¹⁰. We later demonstrated its contribution to the suppressive function of ex vivo-generated tolerogenic DCs through antigen cross-presentation by allowing cation (Na^+) counterflux required for progressive endophagosomal acidification⁵. However, the function of this ion flux in the homeostasis and physiological response of conventional DCs has not been explored and is likely achieved by both TMEM176A and TMEM176B in a redundant fashion⁶.

Unexpectedly, besides myeloid cells, we and others reported a strong expression of *Tmem176a* and *Tmem176b* in the retinoic-acid-receptor-related orphan receptor- γ t-positive (ROR γ t⁺) lymphoid cell family, also referred to as type 3 (or type 17) immune cells, producing the prototypical cytokines IL-17 and IL-22 and including Th17 CD4⁺ T cells, $\gamma\delta$ T17 cells, group 3 innate lymphoid cells (ILC3s) and NKT17 cells^{6,11-14}. Moreover, the Littman group included *Tmem176a/b* in the restricted group of 11 genes whose expression is directly dependent on ROR γ t in Th17 cells¹⁵. However, in our previous study, we found no or only modest effect of *Tmem176b* single deficiency in different models of autoinflammation linked to type 3 immunity⁶. We speculated that the absence of *Tmem176b* could be efficiently compensated by its homolog *Tmem176a*, located in the same genomic locus, thus masking possible phenotypic alterations.

Here we have used germline and conditional (“floxed”) double knock-out (DKO) mice to unequivocally determine the importance of *Tmem176a* and *Tmem176b* in the biology of ROR γ t⁺ cells and conventional DCs in vivo. In that respect, this is the first study exploring the consequence of *Tmem176a/b* double deficiency in vivo. Furthermore, we have combined

these functional results with the elucidation of the precise trafficking of both proteins using a real-time imaging method. Our findings show that, while *Tmem176a/b* appear surprisingly dispensable for ROR γ t⁺ cell functions, these genes are required in the MHC II pathway in DCs for efficient priming of naive CD4⁺ T cells.

Results

Generation of germline and conditional double KO (DKO) mice simultaneously targeting *Tmem176a* and *Tmem176b*

Tmem176a and *Tmem176b* are homolog genes encoding structurally similar four-span transmembrane proteins^{6,10,16} (**Figure 1A**). In the immune system, our previous studies^{6,10,17} combined with the analysis of Immuno-Navigator¹⁸ and Immgen¹⁹ public databases (**Figure S1**) indicate that *Tmem176a* and *Tmem176b* are tightly co-regulated and highly expressed both in conventional DCs and in the ROR γ ⁺ cell family (depicted in **Figure 1B**). Taken together, these observations along with reported evidence of genetic compensation in *Tmem176b*^{-/-} single KO mice⁶ strongly suggested the need to simultaneously target both genes to decipher their function.

As described previously in a methodological study²⁰, we generated a germline double KO (DKO) mouse (**Figure 1C**) in the pure C57BL/6N genetic background. Homozygous DKO mice were born in a Mendelian ratio and appeared normal, without any significant difference in weight from control WT littermates, suggesting that *Tmem176a/b* are not absolutely required, or can be sufficiently compensated, during development.

In order to clearly associate a cell type with a potential phenotypic observation resulting from *Tmem176a/b* deficiency, we also engaged in the generation of a conditional DKO mouse (*Tmem176a/b*^{flox}) (**Figure 1D**) that we crossed to *Rorc*(γ)-Cre and *CD11c*-Cre (*Itgax*-Cre) mice to target ROR γ ⁺ and CD11c⁺ cells, respectively.

***Tmem176a/b* DKO mice exhibit normal ILC3 and Th17 distribution and ROR γ cell-dependent protective functions in the gut mucosa**

Owing to the high expression of *Tmem176a/b* in ROR γ ⁺ cells, we focused our attention on the intestinal mucosa where these cells preferentially localize to exert their sentinel function in response to the gut microbiota²¹. Flow cytometry analysis (gating strategy depicted in **Figure S2A-B**) of CD4⁺ T cells and ILCs in the small intestine and colon lamina propria revealed no differences in the proportions of Th17 or ILC3 subsets between WT and DKO mice (**Figure 2A**). Furthermore, in vitro cytokine production of intestinal CD4⁺ T cells and ILCs was not affected by *Tmem176a/b* double deficiency (**Figure 2B**). Concordant with this, we did not detect any significant change in the level of expression of *Rorc2* (the isoform encoding ROR γ t), *Il23r*, *Il22*, *Il17a* or *Il17f* as well as target genes of the IL-22/IL17 axis in the small intestine and colon of DKO mice (**Figure S2C**).

To test whether *Tmem176a/b* could play a role in ROR γ ⁺ cells in the context of inflammatory responses in the gut mucosa, we used the injury-induced self-resolving model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced acute colitis in which Th17/ILC3-derived IL-22 is pivotal to restore barrier integrity upon epithelial damage^{22,23}. However, both germline DKO and *Tmem176a/b*^{fl/fl}*Rorc-Cre*^{+/-} conditional mice exhibited a similar response to DSS when compared to control mice (**Figure 2C**). Next, we used an infectious colitis model using *Citrobacter rodentium*, a mouse attaching and effacing bacterial pathogen considered as an excellent model of clinically important human gastrointestinal pathogens and against which ILC3s and Th17 have been shown to play a protective and redundant role^{11,24,25}. As shown in **Figure 2D**, *Tmem176a/b* deficiency did not hamper the mouse resistance to this infection. Moreover, although fecal *Citrobacter rodentium* bacterial loads detected by qPCR appeared increased in ROR γ t-specific conditional DKO, this difference did not reach statistical significance and was not found in germline DKO mice compared to respective control mice (**Figure 2E**).

Thus, these results suggest that *Tmem176a/b* are not critical for the development and protective functions of ILC3s and Th17 in the intestinal mucosa.

DCs develop normally in Tmem176a/b-deficient mice

Next, we investigated the effect of *Tmem176a/b* double deficiency in the biology of conventional DCs (cDCs). First, because both genes are highly expressed in the majority of hematopoietic precursors including cDC progenitors (**Figure 1B** and **Figure S1**), we assessed their frequency in the bone marrow but found no alteration in DKO mice (**Figure 3A** and **Figure S3**). Accordingly, the percentages and absolute numbers of CD11c^{high} MHC II⁺ cells in the spleen and, within this population, the proportions of the two main conventional DC subsets, namely cDC1 (CD11b⁻ CD8α⁺) and cDC2 (CD11b⁺ CD8α⁻), were similar between WT and DKO mice (**Figure 3B**). Furthermore, MHC I, MHC II, CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) surface expression on cDC1 and cDC2 were not affected by *Tmem176a/b* deficiency and LPS stimulation elicited an equally strong upregulation of MHC II, CD80 and CD86 at the surface of both WT and DKO cDC subsets (**Figure 3C**). Finally, purified spleen cDCs from WT and DKO mice produced similar basal levels of IL-12 and IL-6 that were both increased with the addition of LPS (**Figure D**).

In the absence of obvious developmental abnormalities of cDCs, we sought to identify dysregulated cellular pathways resulting from the absence of *Tmem176a/b*. Chromatin dynamics reflect with great sensitivity gene regulation and play important roles in immune functions such as trained innate immunity²⁶ or T cell effector/memory differentiation²⁷. To investigate whether epigenetic alterations are present in DKO cDCs we FACS-sorted CD11c^{high} MHC II⁺ cells and performed chromatin immunoprecipitation by targeting lysine H3K27 acetylation (H3K27ac) followed by sequencing (ChIP-seq) to detect active promoters

and enhancers (epigenomics road map). We found that 962 enhancers were significantly differentially acetylated (DA) between WT and DKO cDCs (**Figure 3E-F**). Interestingly, one of the most significantly DA gene regulatory region covered the entire *Cd74* gene (**Figure 3G**) and MHC gene ontology analysis included antigen processing and MHC II protein molecules (**Figure 3H**). Together, these data suggest that *Tmem176a/b* deficiency could impact intracellular processes of the MHC II pathway and lead to selective genetic adaptations. Further supporting a role of *Tmem176a/b* in the MHC II pathway, we found that both homologs were clearly over-expressed in cDC2 when compared to B cells, pDCs and cDC1 (**Figure 3I**), consistent with the propensity of this subset in priming naive CD4⁺ T cells through MHC II antigen presentation²⁸.

Tmem176a/b are required for optimal presentation of exogenous antigens to CD4⁺ T cells by DCs

To determine whether *Tmem176a/b* are required in DCs for antigen presentation in vivo via MHC I or MHC II molecules, we set out to test different models of dominant CD8⁺ or CD4⁺ T cell responses.

First, using a minor histocompatibility transplantation model in which male skin is grafted onto female recipients, we found that WT and DKO exhibited the same rate of graft rejection (**Figure 4A**), suggesting that CD8⁺ T cell priming and effector functions were not impaired in the absence of *Tmem176a/b*. Next, we examined whether anti-tumor immune responses could be influenced by *Tmem176a/b* deficiency. Notably, we hypothesized that DKO could exhibit enhanced anti-tumor immunity owing to a recent study proposing that targeting *Tmem176b* could improve anti-tumor CD8⁺ T-cell response by de-repressing inflammasome activation in myeloid cells²⁹. Subcutaneous injection of OVA-expressing EG7 thymoma led to

detectable tumors within two weeks in all mice and, consistently with the relatively immunogenic nature of this cell line in our experimental conditions, tumor regression was then observed in a large fraction of the mice but without significant difference between WT and DKO mice (**Figure 4B** and **Figure S4**). Furthermore, *Tmem176a/b* deficiency did not impact tumor growth and mouse survival with two aggressive tumor cell lines, MCA101-sOVA fibrosarcoma and B16-OVA melanoma (**Figure 4B** and **Figure S4**). Thus, our results show that the absence of *Tmem176a* and *Tmem176b* does not prevent nor enhance CD8⁺ T-cell responses.

To evaluate CD4⁺ T-cell responses in vivo, we first used the model of experimental autoimmune-encephalomyelitis (EAE) induced by MOG₃₅₋₅₅ peptide or MOG₁₋₁₂₅ protein immunization (**Figure 4C**). Interestingly, whereas EAE developed similarly between WT and DKO mice with MOG peptide immunization (**Figure 4D**), DKO mice appeared less susceptible if the MOG protein was used (**Figure 4E**), thus pointing to a specific role of *Tmem176a/b* in antigen processing before peptide-MHC II complex display at the surface. Because of the high variability of this model, we next turned to a model of delayed-type hypersensitivity (DTH) (**Figure 4F**). Again, we observed that DKO mice differed from WT mice for the DTH response upon challenge in the footpad only if the whole protein was used for the immunization (**Figure 4G-H**). Taken together, these data suggest that *Tmem176a/b* deficiency selectively affects the intracellular processing of exogenous antigens for naive CD4⁺ T-cell priming.

To further test this hypothesis, we directly assessed antigen-specific T-cell proliferation in WT and DKO mice using naive OVA-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells (**Figure 5A**). It is important to note that cDCs are strictly required in this system to induce activation and proliferation of

naive T cells³⁰. As shown in **Figure 5B-C**, CD4⁺ T cell proliferation was markedly diminished in DKO mice in comparison to WT mice whereas CD8⁺ proliferation was not. Importantly, this alteration was not observed in *Tmem176a/b*^{fl/fl}*Rorc-Cre*^{+/-} conditional mice (**Figure 5D**) but was replicated, although to a lesser extent than in germline DKO mice, in *Tmem176a/b*^{fl/fl}*CD11c-Cre*^{+/-} mice (**Figure 5E**).

In vitro antigen-specific CD4⁺ T-cell proliferation was also significantly decreased in the absence of *Tmem176a/b* using GM-CSF-induced bone-marrow derived DCs (BMDCs) only when OVA protein was used (**Figure 5F-G**), while surface expression of MHC II and co-stimulatory molecules remained unaltered (**Figure S5**).

In conclusion, these results show that *Tmem176a/b* have an intrinsic function in DCs to allow efficient presentation of exogenous antigens onto MHC II molecules and priming of naive CD4⁺ T cells.

Tmem176a/b-deficient cDCs exhibit normal antigen uptake and degradation but dysregulated H2-M expression selectively in cDC2

Antigen presentation by MHC II molecules is achieved through a series of complex events (depicted in **Figure 6A**) beginning with the uptake and mild degradation of exogenous antigens and including finely regulated processes in the specialized MHC II compartment (MIIC)³¹.

Both OVA endocytosis and degradation were similar in WT and DKO cDCs (**Figure 6B**), indicating that altered MHC II-mediated antigen presentation by *Tmem176a/b* DCs cannot be explained by a defect in the initial steps of antigen processing.

To determine whether *Tmem176a/b* deficiency could influence the surface or intracellular levels of key players in the MHC II pathway, we analyzed the expression of MHC II (I-A^b), Ii (invariant chain), H2-M and H2-O in splenic B cells, cDC1 and cDC2 by flow cytometry (**Figure 6C**). As expected, cDC1 exhibited the highest levels of intracellular MHC II, Ii and H2-O whereas H2-M was primarily expressed in cDC2, an equilibrium concordant with the intrinsic efficiency of this subset in MHC II processing²⁸. Strikingly, while we did not detect aberrant expression of these molecules at the surface of DKO cells, we found that, intracellular H2-M was paradoxically and selectively over-expressed in the cDC2 subset of DKO mice compared to WT mice (**Figure 6C**, lower left panel).

Taken together, these data suggest that *Tmem176a/b*-mediated function is directly involved in the MIIC for optimal MHC II antigen loading or trafficking.

TMEM176A and TMEM176B traffic in dynamic vesicles between the Golgi apparatus and the endolysosomal compartments

To gain insight into the intracellular function of TMEM176A/B ion channels, we aimed to elucidate their subcellular localization that remains elusive as different studies reached different conclusions^{5,6,32}. To this end, we used the Retention Using Selective Hooks (RUSH) system³³, a two-state assay allowing fluorescence-based analysis of intracellular trafficking in living cells at physiological temperature (**Figure 7A**). We performed dual-color imaging using multiple organelle-specific proteins or probes (**Figure 7B**) to track the intracellular fate of TMEM176A/B from the endoplasmic reticulum (ER). We used HeLa cells as they allow higher resolution of intracellular compartments compared to immune cells. Addition of biotin triggered a rapid change in the TMEM176B signal from a network of tubular elements characteristic of the ER to a pattern reminiscent of the Golgi apparatus but which rapidly

evolved into multiple dynamic vesicles (**Figure 7C** and **Supplementary Video 1**). TMEM176A and TMEM176B exhibited a very similar intracellular dynamic, as measured by strong colocalization throughout the time of acquisition (**Figure 7D** and **Supplementary Video 2**).

Confirming our previous hypothesis that TMEM176B traffics through but does not accumulate in the Golgi apparatus⁶, it clearly separated from Golgin-84, a Golgi-resident protein. After 10–15 min of incubation with biotin, Golgin-84 reached the Golgi apparatus where it stayed after longer incubation time in contrast to TMEM176B (**Figure 7E-F** and **Supplementary Video 3**). We then examined a variety of markers depicted in **Figure 7G**. We did not, or only marginally, observe accumulation at the plasma membrane, a result that was confirmed by co-imaging with CD44. Interestingly, TMEM176B-bearing vesicles could interact with RAB5⁺ early endosomes as well as with RAB7⁺ late endosomes. We generated a LAMP1 (CD107a) RUSH construct to best reveal endolysosomes and also observed a strong association with TMEM176B trafficking during the post-Golgi time frame. Of interest, TMEM176B could be found colocalized with TNF or TfR (transferrin receptor), during the late events of endocytosis/recycling of these proteins. However, TMEM176B was not associated with RAB4, a marker of recycling endosomes. Although we cannot rule out alternate recycling pathways, these results suggest that TMEM176A/B follow a relatively selective route among the various vesicular compartments of the cell. In this line, TMEM176B did not traffic through mitochondria labeled by the Mitotracker probe but was significantly associated with LysoTracker that preferentially marks acidic vesicles. Moreover, we found some colocalization signals using a cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (CD-MPR) RUSH construct but even stronger association with the monomeric clathrin adaptor GGA1, known to decorate the carrier vesicles budding from the TGN and merging toward the endosomes³⁴.

Taken together, these data show that TMEM176A/B ion channels preferentially localize in the late endosomal compartment and in vesicular vesicles between the Golgi and the endolysosomal system.

TMEM176B colocalizes with HLA-DM in MHC II-expressing cells

Given the requirement of *Tmem176a/b* in MHC II antigen presentation, the selective alteration of H2-M expression in cDC2 and the preferential trafficking of TMEM176A/B in the late endosomal compartment, we asked whether these ion channels could localize in the MIIC. To recapitulate the MHC II pathway in HeLa cells, we used the HeLa-CIITA cell line that stably expresses the transactivator CIITA³⁵. To reveal MHC II (HLA-DR) and HLA-DM localization in these cells, we used plasmid constructs expressing YFP tagged to the beta or alpha chains of each molecule, respectively, as described in Zwarts *et al.*³⁶. Colocalized signals were detected between TMEM176B and HLA-DR, mostly in intracellular vesicles (**Figure 7H**). However, a more pronounced association was observed with HLA-DM in intracellular compartments presumably highlighting the MIIC.

Thus, these results strongly suggest that TMEM176A/B exert their function directly in the MIIC to contribute to efficient MHC II peptide loading and/or trafficking.

Discussion

Finely tuned ion influx and efflux result from various intricate interplays of multiple channels likely tailored for each type of cell and maturation status. The intriguing high expression of TMEM176A and TMEM176B cation channels in both ROR γ t⁺ lymphoid cells and DCs logically raises the question of their specific role in these two very distinct immune cell types. Based on expression and functional data, we reasoned that each gene has the potential to compensate for each other and that simultaneous targeting would be a requisite to avoid such redundancy.

We present here the first functional study of *Tmem176a/b* double KO (DKO) mice, either germline or conditional. Given the broad tissue expression of *Tmem176a/b*, the “floxed” conditional mouse represents an invaluable tool to achieve Cre-mediated cell-specific deletion and document the role of these ion channels in virtually any tissue or cell of interest. Indeed, there is a growing interest in understanding the role of these homolog genes that are over-expressed in a wide range of cell types other than immune cells including fibroblast subsets³⁷, neurons³⁸, adipocytes³⁹ or tumor cells^{40–42}, likely adapting a universal mechanism of intracellular ion flux regulation to their specific needs. Importantly, these *Tmem176a/b* DKO mice were generated directly in a pure genetic background (C57BL/6N) thus avoiding incorrect interpretations resulting from carryover of gene variants of a different background surrounding the targeted locus^{43,44}.

The striking expression of *Tmem176a/b* in all type 3 immune cells and their dependency on the master transcription factor ROR γ t⁺¹⁵ make these homologs promising candidates to uncover novel aspects of ROR γ t⁺ cell biology beyond their cytokine production and could represent a novel therapeutic entry point for treating immune-mediated diseases. However,

our results indicate that ROR γ t-dependent intestinal repair and host defense functions are not compromised in the absence of *Tmem176a/b*. Furthermore, the normal development MOG_{35–55} peptide-induced EAE suggest that these genes are not required for the pathogenicity of Th17 in this model. Investigating the transcriptomic and epigenetic profiles of purified DKO ILC3s or Th17 cells may expose compensatory mechanisms notably involving the regulation of other ion channels that could sufficiently counterbalance the absence of *Tmem176a/b*. It is also tempting to speculate that these homologs could be required for IL-17/IL-22-independent functions in ROR γ t⁺ cells, including the regulation of anti-commensal effector CD4⁺ T-cells by ILC3s through MHC II-mediated inhibitory presentation^{45,46}. Although *Tmem176a/b*^{fl/fl}*Rorc*-Cre^{+/-} conditional mice did not exhibit increased CD4⁺ T cell activation and proliferation nor neutrophil accumulation in the colonic lamina propria in comparison to control mice (data not shown), the fact that ILC3s selectively share with DCs the expression of MHC II molecules is in favor of a pivotal role of *Tmem176a/b* in this adaptive function.

In view of the recent study by Segovia *et al.*²⁹ using *Tmem176b* single KO mice or an ion channel inhibitory molecule, our results do not support the hypothesis that inhibiting TMEM176A/B-mediated ion flux could enhance anti-tumor CD8⁺ T-cell response *in vivo*. Moreover, we did not observe increased IL-1 β production by *Tmem176a/b*-deficient BMDCs (data not shown). One can speculate that TMEM176B must be targeted alone, leaving TMEM176A function intact, to obtain such phenotype, and that the effect of the inhibitory molecule is therefore achieved in a selective manner. Alternatively, because of the 129 genetic background origin of the *Tmem176b* single KO mouse⁵, confounding genetic factors could be invoked, despite >10 backcrosses onto the C57BL/6 background and the use of littermates⁴⁷.

We initially reported that *Tmem176a/b* were highly expressed in cDCs but not in pDCs^{10,17}, likely a consequence of E2-2-mediated repression as revealed by Ghosh *et al.* for *Tmem176a*⁴⁸. Remarkably, recent mouse and human single-cell RNA-seq analysis highlighted these homologs as markers of selective DC subsets, both in mouse and human⁴⁹⁻⁵¹. Notably, the association of *TMEM176B* expression with a subset of cDC2 in Binnewies *et al.*⁵¹ is concordant with our data in the mouse showing that *Tmem176a/b* are markedly over-expressed in cDC2 compared to cDC1. cDC2 exhibit an overall dominance in MHC II presentation in vivo resulting from the combination of their intrinsic efficiency^{28,52} and their favorable position within lymphoid tissues for antigen uptake⁵³. Consistently, we found that *Tmem176a/b* deficiency selectively affected the capacity of DCs to prime naive CD4⁺ T cells but not CD8⁺ T cells in vivo. Our results point to a defect in the intracellular processing events for exogenous antigen presentation to MHC II molecules. However, this functional alteration is not complete and it is possible that, in the same manner as in ILC3s, compensatory mechanisms develop in DCs in the absence of *Tmem176a/b*. In support of this hypothesis, the fact that H2-M was found selectively over-expressed in cDC2 of DKO mice suggests an adaptation to alleviate a defect in the MIIC for peptide loading onto MHC II molecules. Alternatively, this expression may also reflect an incorrect intracellular localization of H2-M, therefore disrupting the optimal processes leading to MHC II presentation.

The analysis of *TMEM176A/B* intracellular dynamics enabled us to clearly delineate that they preferentially traffic in the late endolysosomal system in close relationship with the Golgi apparatus. In contrast with the limitations in sensitivity and the non-dynamic nature of classical immunostaining, the RUSH system was instrumental in revealing the route taken by *TMEM176A/B* from the ER and beyond the Golgi apparatus. However, because we focused

on the first hour of trafficking after release in most of our analyses, we cannot exclude that TMEM176A/B can eventually reach other compartments over time.

The strong colocalization found with HLA-DM in HeLa-CIITA cells supports the hypothesis of a direct role in the MIIC. TMEM176A/B-mediated cation (Na^+) efflux could participate in the regulated acidification of this compartment as a counterion conductance⁵⁴. TMEM176A/B could be located on the limiting membrane of the MIIC or on intraluminal vesicles (ILVs) where a direct interaction with HLA-DM would be possible. In this regard, independently of their ion channel function, it is conceivable that these four-span transmembrane proteins act similarly to tetraspanin molecules to stabilize DM-MHC II interaction⁵⁵. On the same note, given the reported genetic association between *TMEM176A* and HDL cholesterol levels in human⁵⁶, TMEM176A/B function may be connected to cholesterol-containing microdomains for efficient MHC II trafficking⁵⁷. High resolution imaging, FRET analysis or the characterization of organelle-specific disruption in DKO DCs could be informative to uncover the precise role of TMEM176A/B in the MHC II pathway.

In conclusion, while the intrinsic role of TMEM176A/B in ROR γ t⁺ cells remains to be further explored, we found that these cation channels play a substantial role in the MHC II pathway to ensure optimal naive CD4⁺ T cell priming by DCs.

Methods

Mice

Tmem176a/b double KO (DKO) mice were generated by a dual targeting approach using the CRISPR–Cas9 system as previously described²⁰. DKO mice used in this study were generated in the C57BL/6N genetic background. Three consecutive backcrosses with C57BL/6N mice were performed before intercrossing heterozygous mice. To control for cage-dependent microbiota variations, WT and DKO mice were systematically co-housed directly after weaning following sex- and age-matching.

Conditional DKO mouse carrying a « floxed » *Tmem176a/b* allele (*Tmem176a/b*^{fl}) were generated at Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). Briefly, two consecutive rounds of ES cell (C57BL/6N genetic background) modifications using two independent selection cassettes were realized to insert LoxP sites on both sides of *Tmem176a* and *Tmem176b* first coding exons. F0 mouse chimera were crossed to a FlpO deleter mouse⁵⁸ (pure C57BL/6N background) to remove the FRT- and F3-flanked Neomycin and Hygromycin selection cassettes abutted to the two LoxP sites. Allele transmission was verified on F1 mice before rederivation and housing in a SPF mouse facility. *Tmem176a/b*^{fl/wt} heterozygous mice were crossed to BAC transgenic *Rorc*(γ t)-Cre mice (generated by Gérard Eberl⁵⁹ and provided by Bernhard Ryffel) or *CD11c*-Cre mice (*Itgax*-Cre, generated by Boris Reizis⁶⁰ and provided by Véronique Godot). Following intercrossing, co-housed, sex- and age-matched *Tmem176a/b*^{fl/fl} homozygous littermates carrying or not a transgenic Cre allele were used for experiments.

OT-I.*Ly5.1* homozygous mice were obtained by intercrossing OVA-specific TCR-transgenic OT-I mice (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Crl) (Charles River) with *Ly5.1* mice (B6.SJL-*PtprcaPepcb/BoyCrl*) (Charles River).

OT-II.*Ly5.1.Foxp3EGFP* homozygous mice were obtained by intercrossing OVA-specific TCR-transgenic OT-II mice (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/Crl) (Charles River) with *Ly5.1* mice (B6.SJL-*PtprcaPepcb/BoyCrl*) (Charles River) and *Foxp3EGFP* reporter mice (generated by Bernard Malissen⁶¹).

All mice used for experiments were between 8 and 25 weeks of age and kept under specific pathogen-free conditions. Experimental procedures were carried out in strict accordance with the protocols approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Pays de la Loire and authorized by the French Government's Ministry of Higher Education and Research.

Chemically-induced acute colitis

Mice were given 2% dextran sulfate sodium (DSS) (36,000–50,000 MW, MP Biomedical) in drinking water ad libitum for 7 days followed by a recovery period without DSS. Mice were monitored and weighed daily.

***Citrobacter rodentium* infection**

Citrobacter rodentium (DBS100, ATCC 51459) were culture aerobically at 37°C overnight at 200 rpm in Luria-Bertani (LB) broth medium (MP Biomedicals) and then diluted 1:10 in fresh LB medium until the concentration of bacteria reached optical density 600. Mice were pre-treated with 750 mg/L metronidazole (Sigma) in 2.5% sucrose drinking water for 4 days as previously described⁶², followed by 3 days with regular drinking water. Mice were then

fasted 8 h before the infection by oral gavage with 2×10^9 colony-forming units (CFUs) of *C. rodentium* resuspended in sterile 0.9% NaCl. Bacterial concentration was assessed via serial dilution on LB agar plates to confirm the CFUs administered. Mice were monitored and weighed daily. Faeces were collected at days 0 and 6 post-infection for detection of *C. rodentium* by qPCR.

Skin transplantation

Mice were anesthetized with a mixture of 5% xylazine (Rompun) and 18% ketamine in PBS (170 μ L) injected intraperitoneally (8.5 mg/kg of xylazine and 76.5 mg/kg of ketamine per mouse). Square skin grafts (1 cm²) were prepared from the tail of male donors and transplanted on the shaved left flank of female recipients. The grafts were fixed to the graft bed with 10-12 interrupted sutures and were covered with protective tape. Mice were monitored every other day and graft rejection was defined as complete sloughing or a dry scab.

Tumor growth models

EG7, MCA101-sOVA⁶³ (provided by Clotilde Théry) and B16-OVA tumor cells were recovered from log phase in vitro growth and 1×10^6 cells were injected subcutaneously in 50 μ L of cold PBS into the flank skin of recipient mice. Tumor growth was measured in a blind fashion with a caliper and expressed as the area based on two perpendicular diameters. Mice were monitored daily and were euthanized when tumor size reached 289 mm².

Experimental Autoimmune-Encephalomyelitis (EAE)

For EAE induced with MOG peptide, mice were immunized subcutaneously at the base of the tail and lower flanks with 200 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK,

GenScript) emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma) supplemented with Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco Laboratories) at 8 mg/mL (400 µg/mL per mouse). Pertussis toxin (200 ng, Calbiochem) was injected intraperitoneally on the day of immunization and 2 days later.

For EAE induced with MOG protein⁶⁴, mice were immunized subcutaneously at the base of the tail and lower flanks with 500 µg of mMOGTag protein (mouse MOG₁₋₁₂₅ extracellular domain fused to a tag for stability and purification purposes) provided by Steven Kerfoot and emulsified in complete Freund's adjuvant. Pertussis toxin (250 ng) was injected intraperitoneally on the day of immunization and 2 days later.

Mice were scored daily for EAE clinical signs on a scale of 0–5 : 0, no disease; 1, complete limp tail; 2, limp tail with unilateral hindlimb paralysis; 3, bilateral hindlimb paralysis; 4, bilateral hindlimb paralysis and forelimb weakness (end point). The observer was blinded to the genotype during the scoring.

Delayed-type hypersensitivity (DTH) assay

Mice were immunized subcutaneously at the base of the tail and lower flanks with 50 µg of whole OVA protein (grade V, Sigma) or OVA₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) peptide (GenScript) emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma). After 7 days, mice were challenged with 250 µg of heat-aggregated OVA (2 min incubation at 100°C) injected (20 µL, s.c.) in the right hind footpad whereas the left hind footpad received 250 µg of heat-aggregated BSA (Sigma) as a control for non-specific inflammation. Footpad thickness was measured prior to, 24 h and 48 h after injection with an electronic digital micrometer. The observer was blinded to the genotype during the scoring.

Flow cytometry analysis and cell sorting

Antibodies and panels used in this study for FACS analysis and cell sorting are listed in Supplementary Table 1. Red blood cells were lysed with ammonium chloride. Small intestine and colon lamina propria (siLP and cLP) cells were prepared as previously described⁶. Before all stainings, dead cells were marked for exclusion using Fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience) or DAPI (Thermo Fisher Scientific) followed by Fc receptor blocking using CD16/32 antibody (BD Biosciences). Intracellular stainings were realized using eBioscience Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set. FACS analyses were performed using BD FACS Canto II or a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences) and FlowJo (Treestar) software. For mean fluorescence intensity (MFI) analysis, values were adjusted by subtracting the basal signal from fluorescence minus one (FMO) staining for each marker. Absolute cell numbers were determined using CytoCount microspheres (Dako, Agilent). Total and surface expression analysis of MHC II, Ii (invariant chain, CD74), H2-M and H2-O in spleen cDC1 and cDC2 were performed with or without a fixation/permeabilization step, respectively, and by gating on B cells (B220⁺CD11c⁻), cDC1 (B220⁻CD11c⁺CD11b⁻CD8 α ⁺) or cDC2 (B220⁻CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁻). H2-M ($\alpha\beta$ 2 dimer) staining was revealed using a FITC-conjugated anti-rat IgG1 antibody. Alexa Fluor 647-conjugated anti-H2-O β was provided by Liza Denzin⁶⁵.

Cells were FACS-sorted using BD FACSAria II (BD Biosciences). Intestinal CD3⁺CD5⁺CD4⁺ T cells and CD3⁻CD5⁻CD127⁺ ILCs (first gated on CD45^{+/low}CD11b/c⁻CD19⁻CD90⁺ cells) were FACS-sorted from the lamina propria of the small intestine and colon (pooled). For spleen cDCs used in epigenetic analysis and in vitro culture, CD11c⁺ cells were first stained with a PE-conjugated anti CD11c antibody and enriched using magnetic-activated cell sorting (Anti-PE MicroBeads, Miltenyi Biotec) before FACS-sorting of CD11c^{high}MHC II⁺ cells at high purity (>98%). For RT-qPCR analysis, B cells (CD19⁺B220⁺CD11c⁻), pDCs (CD19⁻B220⁺CD11c⁺) cDC1 (CD19⁻B220⁻CD11c^{high}CD11b⁻CD8 α ⁺) and cDC2 (CD19⁻B220⁻CD11c^{high}CD11b⁺CD8 α ⁻) were

FACS-sorted from the spleen of WT mice. OVA-specific CD8⁺ T cells were purified from the spleen of OT-I.*Ly5.1* mice using CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). OVA-specific CD4⁺EGFP⁻ cells T conventional cells were FACS-sorted from the spleen of OT-II.*Ly5.1.Foxp3EGFP* mice after enrichment using CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec).

In vivo antigen-specific T-cell proliferation assay

OVA-specific naive CD8⁺ T and CD4⁺ T conventional cells from OT-I.*Ly5.1* and OT-II.*Ly5.1.Foxp3EGFP* mice, respectively, were labeled with Cell Proliferation Dye (CPD) eFluor 670 (eBioscience) and co-injected (i.v.) at a 1:1 ratio (total of 1–2×10⁶ cells per mouse). One day later, recipient mice were administered (i.p.) 100 µg EndoFit Ovalbumin protein (InvivoGen). After three days, spleens were harvested and proliferation (CPD dilution) of injected cells (CD45.1⁺CD8⁺ or CD45.1⁺CD4⁺) was assessed by flow cytometry.

BMDC generation and in vitro antigen-specific T-cell proliferation assay

Bone marrow cells were cultured (0.5×10⁶ cells per mL) in the presence of 20 ng/mL GM-CSF (Miltenyi Biotec) in complete RPMI medium. By day 8, the cells, referred to as BMDCs, were harvested and incubated in 96-well plate (1×10⁴ cells per well) with 250 µg/mL EndoFit Ovalbumin protein (InvivoGen) or 10 µg/mL OVA_{323–339} (ISQAVHAAHAEINEAGR) peptide (GenScript). After 5 h, the cells were washed three times and CPD-labeled CD4⁺ Foxp3⁻ T cells purified from OT-II.*Ly5.1.Foxp3EGFP* mice were added and proliferation (CPD dilution) was assessed by flow cytometry 3 days later.

In vitro stimulation and analysis of cDCs and BMDCs

Purified spleen cDCs were plated in 96-well plate at 1×10⁵ cells and incubated with or without 0.5 µg/mL LPS (Sigma) for 16 h before the quantification of IL-12p40 and IL-6 in the

supernatant by ELISA (BD Biosciences). For phenotypic analysis (MHC II, MHC I, CD80, CD86) by flow cytometry, bulk spleen cells (comprising cDC1 and cDC2 identified using the markers CD11c, CD11b and CD8 α as indicated) or BMDCs were stained freshly or stimulated for 6 h with 0.5 μ g/mL LPS.

In vitro stimulation of CD4⁺ T cells and ILCs

Purified intestinal CD4⁺ T cells and ILCs were cultured in vitro in 96-well plate (10,000 cells per well in triplicates) in complete medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) for 18 hours in the presence of anti-CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific) at a ratio of 2:1 or IL-23 \pm IL-7, IL-2, IL-1 β (R&D Systems) at 50 ng/mL (except IL-2 at 50 IU/mL), respectively. IL-17A, IL-17F, IL-22 (R&D Systems) and IFN γ (BD Biosciences) were then measured in the supernatant by ELISA.

In vitro antigen uptake and degradation assays

Antigen endocytosis and degradation in cDCs (CD11c⁺MHCII⁺) were assessed by flow cytometry after incubating one million bulk splenocytes in 96-well plate with 50 μ g/mL OVA-FITC or DQ-OVA (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), respectively. As controls, cells were incubated at 4°C or treated with Bafilomycin A (Sigma).

ChIP-seq experiments

Highly purified spleen cDCs (1×10^6 cells from two pooled mice for each preparation) were resuspended in 40 μ L of PBS. Cells were lysed and chromatin was fragmented with 300 units of Micrococcal nuclease (MNase) (M0247S, New England Biolabs) per well for 10 min at 37°C. After full speed centrifugation, supernatants were collected and filled up to 400 μ L. Two μ g of anti-H3K27ac (39133, Active Motif) was used for immunoprecipitation overnight

at 4°C. Twenty five µL of G-protein dynabeads (Invitrogen) were added for rotation for 4 h at 4°C. Beads were then washed twice with 200 µL wash buffers with increasing salt concentration. CHIP beads were eluted in 50 µL of CHIP elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS). CHIP and input samples were digested with 250 µg/mL proteinase K (GEXPRK006R, Eurobio) in 50 µL TE buffer for 1 h at 63°C. CHIP DNA was purified using phenol chlorophorm. Libraries were then prepared according as previously described⁶⁶. Libraries were verified and equimolar pools were sequenced on a NextSeq 500 (75 bp single-end).

ChIP-seq analysis

Single-end reads were mapped to the mm10 genome by the BWA algorithm and reads mapping to non-canonical and mitochondrial chromosomes were also removed. For each sample, ChIP-seq peaks were detected using DFilter at a *P*-value threshold of 1×10^{-6} . All samples passed the quality controls (Fraction of reads in peaks [FRIP] > 3% and non-redundancy fraction [NRF] > 0.9). A set of consensus peaks was then obtained by taking the union of all peaks and counting reads these peaks using Bedtools. To perform Differential Peak Calling, differentially acetylated (DA) peaks were determined using edgeR after a counts per million (cpm) normalization. DA peaks were defined with a Benjamini-Hochberg Q-value $\leq 5\%$. For heatmap representation, peaks were rlog transformed. To determine gene ontology enrichment in up-regulated peaks the GREAT tool was used.

Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR) was performed using ViiA 7 Real-Time PCR System and Fast SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Primer sequences are listed in Supplementary Table 2).

For *Citrobacter rodentium* bacterial load quantification, genomic DNA (gDNA) from faeces was purified using QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) and the *EspB* gene was detected using specific primers and normalized with total bacterial gDNA (*16S* gene) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

For mRNA quantification, total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit or Micro Kit (Qiagen). Reverse transcription was performed using M-MLV Reverse Transcriptase and random primers following manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Gene-specific primers were designed over different exons to prevent amplification of genomic DNA. Gene expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) and expressed in arbitrary units using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

RUSH system

RUSH experiments were realized as previously described by the Perez group³³. Plasmid constructs are listed in Supplementary Table 3. When indicated, 250 nM MitoTracker Deep Red or 100 nM LysoTracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific) were added 30 min before imaging. HeLa cells (1.5×10^4) were seeded into a μ -Slide 8 Well Chamber Slide (Ibidi) and transfected using Lipofectamine LTX Plus Reagent (Thermo Fisher Scientific). After 24 h, the medium was replaced by medium containing 40 μ M of D-biotin (Sigma). The initial time-lapse acquisition characterizing TMEM176B was performed at Institut Curie (Paris, France) with a thermostat controlled chamber using an Eclipse 80i microscope (Nikon) equipped with a spinning disk confocal head (Perkin) and an Ultra897 iXon camera (Andor). Subsequent RUSH analyses were performed at MicroPICell facility (Nantes, France) with a Confocal Nikon A1 RS microscope. To analyze molecule colocalization, we used the plugin Colocalization Studio that contains pixel-based methods that were introduced in section

Pixel-Based Methods in the Icy platform. HeLa-CIITA (generated by Philippe Benaroch³⁵) were used for the analysis of HLA-DR and HLA-DM.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism (La Jolla, CA, USA) using the Mann-Whitney test or, for survival rates, using the Log-rank (Mantel-cox) test. *P* values < 0.05 were considered significant.

Acknowledgments

This work was supported by IHU-Cesti, Nantes Métropole and Région des Pays de la Loire, Paris Scientifiques Régionaux. This work was realized in the context of the Labex IGO program supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0016-01). M. Lancien was supported by a PhD fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number ECO20160736078). We are grateful to Philippe Hulin, Steven Nedellec and Magalie Feyeux from the MicroPICell imagery core facility (Nantes, France) for excellent assistance with confocal microscopy and to Claire Usal, Pierre Pajot and Jean-Marc Merieau for mouse housing and experimental help.

Work performed in the F. Perez laboratory was funded by Centre National de la Recherche Scientifique, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20120323723), the Labex CellTisPhyBio, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV2-0003-01). The laboratory of F. Perez is part of Labex CellTisPhyBio (11-LBX-0038) and Idex Paris Sciences et Lettres (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL). The authors acknowledge the Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBISA), Institut Curie, a member of the French National Research Infrastructure, France-BioImaging (ANR10-INBS-04).

Author contributions

C.L., M.L. and M.C.C. designed and supervised the research. M.L., G.Bienvenu, L.G, S.S., E.M., S.R., A.Molle, C.F., G.Beriou P.K., S.A.R, V.D.S., G.Boncompain, J.P. and C.L. performed experiments and analyzed data. A.E., C.F., L.B-D and F.C., performed experiments. S.K., G.M. and F.P. contributed to key research tools and experiment design. A.Moreau., E.C., S.C., F.P., R.J. and J.P. helped with the study design and data interpretation. C.L., M.L., J.P., A.Molle and C.F. wrote the paper.

References

1. Feske, S., Wulff, H. & Skolnik, E. Y. Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 291–353 (2015).
2. Vaeth, M. *et al.* Ca²⁺ Signaling but Not Store-Operated Ca²⁺ Entry Is Required for the Function of Macrophages and Dendritic Cells. *J. Immunol.* **195**, 1202–1217 (2015).
3. Maschalidi, S. *et al.* UNC93B1 interacts with the calcium sensor STIM1 for efficient antigen cross-presentation in dendritic cells. *Nat. Commun.* **8**, 1640 (2017).
4. Vandier, C. & Velge-Roussel, F. Regulation of human dendritic cell immune functions by ion channels. *Curr. Opin. Immunol.* **52**, 27–31 (2018).
5. Segovia, M. *et al.* Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival Through *Tmem176b* -Dependent Antigen Cross-Presentation: Immunoregulatory Mechanisms of Autologous DCs. *Am. J. Transplant.* **14**, 1021–1031 (2014).
6. Drujont, L. *et al.* ROR γ t+ cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Sci. Rep.* **6**, 23682 (2016).
7. Nickles, D. *et al.* Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4194–4205 (2013).
8. de Jong, K. *et al.* Genome-wide interaction study of gene-by-occupational exposure and effects on FEV 1 levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1664-1672.e14 (2015).
9. Grunin, M., Hagbi-Levi, S., Rinsky, B., Smith, Y. & Chowers, I. Transcriptome Analysis on Monocytes from Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Sci. Rep.* **6**, 29046 (2016).
10. Louvet, C. *et al.* Identification of a New Member of the CD20/FcepsilonRIbeta Family Overexpressed in Tolerated Allografts. *Am. J. Transplant.* **5**, 2143–2153 (2005).
11. Song, C. *et al.* Unique and redundant functions of NKp46⁺ ILC3s in models of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **212**, 1869–1882 (2015).
12. Engel, I. *et al.* Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat. Immunol.* **17**, 728–739 (2016).
13. Kohlgruber, A. C. *et al.* $\gamma\delta$ T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nat. Immunol.* **19**, 464–474 (2018).
14. Tan, L. *et al.* Single-Cell Transcriptomics Identifies the Adaptation of Scart1+ V γ 6+ T Cells to Skin Residency as Activated Effector Cells. *Cell Rep.* **27**, 3657-3671.e4 (2019).
15. Ciofani, M. *et al.* A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. *Cell* **151**, 289–303 (2012).
16. Zuccolo, J. *et al.* Phylogenetic Analysis of the MS4A and TMEM176 Gene Families. *PLoS ONE* **5**, e9369 (2010).

17. Condamine, T. *et al.* Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 507–515 (2010).
18. Vandenbon, A. *et al.* Immuno-Navigator, a batch-corrected coexpression database, reveals cell type-specific gene networks in the immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E2393-2402 (2016).
19. The Immunological Genome Project Consortium *et al.* The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1091–1094 (2008).
20. Lemoine, A., Chauveau-Le Friec, G., Langa, F. & Louvet, C. Generation of a Double KO Mouse by Simultaneous Targeting of the Neighboring Genes Tmem176a and Tmem176b Using CRISPR/Cas9: Key Steps from Design to Genotyping. *J. Genet. Genomics* **43**, 329–340 (2016).
21. Eberl, G. ROR γ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol.* **10**, 27–34 (2017).
22. Sugimoto, K. *et al.* IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* **118**, 534–544 (2008).
23. Zenewicz, L. A. *et al.* Innate and Adaptive Interleukin-22 Protects Mice from Inflammatory Bowel Disease. *Immunity* **29**, 947–957 (2008).
24. Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* **14**, 282–289 (2008).
25. Rankin, L. C. *et al.* Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **17**, 179–186 (2016).
26. Pace, L. *et al.* The epigenetic control of stemness in CD8⁺ T cell fate commitment. *Science* **359**, 177–186 (2018).
27. Saeed, S. *et al.* Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* **345**, 1251086–1251086 (2014).
28. Dudziak, D. *et al.* Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo. *Science* **315**, 107–111 (2007).
29. Segovia, M. *et al.* Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell* **35**, 767-781.e6 (2019).
30. Meredith, M. M. *et al.* Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J. Exp. Med.* **209**, 1153–1165 (2012).
31. ten Broeke, T., Wubbolts, R. & Stoorvogel, W. MHC Class II Antigen Presentation by Dendritic Cells Regulated through Endosomal Sorting. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a016873–a016873 (2013).

32. Shui, W. *et al.* Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16952–16957 (2008).
33. Boncompain, G. *et al.* Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat. Methods* **9**, 493–498 (2012).
34. Chen, Y., Gershlick, D. C., Park, S. Y. & Bonifacino, J. S. Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers. *J. Cell Biol.* **216**, 4141–4151 (2017).
35. Stumptner-Cuvelette, P. *et al.* HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12144–12149 (2001).
36. Zwart, W. *et al.* Spatial Separation of HLA-DM/HLA-DR Interactions within MIIC and Phagosome-Induced Immune Escape. *Immunity* **22**, 221–233 (2005).
37. Lurton, J., Rose, T. M., Raghu, G. & Narayanan, A. S. Isolation of a Gene Product Expressed by a Subpopulation of Human Lung Fibroblasts by Differential Display. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 327–331 (1999).
38. Maeda, Y. *et al.* Role of Clast1 in development of cerebellar granule cells. *Brain Res.* **1104**, 18–26 (2006).
39. Kang, S. *et al.* Identification of nuclear hormone receptor pathways causing insulin resistance by transcriptional and epigenomic analysis. *Nat. Cell Biol.* **17**, 44–56 (2015).
40. Otsubo, T. *et al.* Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Sci.* **105**, 560–567 (2014).
41. Gao, D. *et al.* Methylation of *TMEM176A* is an independent prognostic marker and is involved in human colorectal cancer development. *Epigenetics* **12**, 575–583 (2017).
42. Ryu, S.-H. *et al.* Oncogenic Ras-mediated downregulation of Clast1/LR8 is involved in Ras-mediated neoplastic transformation and tumorigenesis in NIH3T3 cells. *Cancer Sci.* **101**, 1990–1996 (2010).
43. Vanden Berghe, T. *et al.* Passenger Mutations Confound Interpretation of All Genetically Modified Congenic Mice. *Immunity* **43**, 200–209 (2015).
44. Chisolm, D. A. *et al.* Defining Genetic Variation in Widely Used Congenic and Backcrossed Mouse Models Reveals Varied Regulation of Genes Important for Immune Responses. *Immunity* **51**, 155-168.e5 (2019).
45. Hepworth, M. R. *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4⁺ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* **498**, 113–117 (2013).
46. Hepworth, M. R. *et al.* Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells. *Science* **348**, 1031–1035 (2015).

47. Dikiy, S. & Rudensky, A. Y. Mouse Watch: A Cautionary Tale. *Immunity* **51**, 10–12 (2019).
48. Ghosh, H. S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K. L. & Reizis, B. Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* **33**, 905–916 (2010).
49. Jaitin, D. A. *et al.* Massively Parallel Single-Cell RNA-Seq for Marker-Free Decomposition of Tissues into Cell Types. *Science* **343**, 776–779 (2014).
50. Villani, A.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**, eaah4573 (2017).
51. Binnewies, M. *et al.* Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4⁺ T Cell Immunity. *Cell* **177**, 556–571.e16 (2019).
52. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
53. Gerner, M. Y., Casey, K. A., Kastenmuller, W. & Germain, R. N. Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J. Exp. Med.* **214**, 3105–3122 (2017).
54. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 50–61 (2010).
55. van den Hoorn, T., Paul, P., Janssen, L., Janssen, H. & Neefjes, J. Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression. *J. Cell Sci.* **125**, 328–339 (2012).
56. Global Lipids Genetics Consortium. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat. Genet.* **45**, 1274–1283 (2013).
57. Kuipers, H. F. *et al.* Statins Affect Cell-Surface Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules by Disrupting Cholesterol-Containing Microdomains. *Hum. Immunol.* **66**, 653–665 (2005).
58. Birling, M.-C., Dierich, A., Jacquot, S., Héroult, Y. & Pavlovic, G. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *genesis* **50**, 482–489 (2012).
59. Lochner, M. *et al.* In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17⁺ and regulatory IL-10⁺ Foxp3⁺ RORγt⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **205**, 1381–1393 (2008).
60. Caton, M. L., Smith-Raska, M. R. & Reizis, B. Notch–RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8[−] dendritic cells in the spleen. *J. Exp. Med.* **204**, 1653–1664 (2007).
61. Wang, Y. *et al.* Th2 Lymphoproliferative Disorder of *Lat*^{Y136F} Mutant Mice Unfolds Independently of TCR-MHC Engagement and Is Insensitive to the Action of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **180**, 1565–1575 (2008).

62. Wlodarska, M. *et al.* Antibiotic Treatment Alters the Colonic Mucus Layer and Predisposes the Host to Exacerbated *Citrobacter rodentium* -Induced Colitis. *Infect. Immun.* **79**, 1536–1545 (2011).
63. Zeelenberg, I. S. *et al.* Targeting Tumor Antigens to Secreted Membrane Vesicles *In vivo* Induces Efficient Antitumor Immune Responses. *Cancer Res.* **68**, 1228–1235 (2008).
64. Jain, R. W., Dang, A. K. & Kerfoot, S. M. Simple and Efficient Production and Purification of Mouse Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Studies. *J. Vis. Exp.* 54727 (2016).
65. Fallas, J. L., Yi, W., Draghi, N. A., O'Rourke, H. M. & Denzin, L. K. Expression Patterns of H2-O in Mouse B Cells and Dendritic Cells Correlate with Cell Function. *J. Immunol.* **178**, 1488–1497 (2007).
66. Sun, W. *et al.* Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell* **167**, 1385-1397.e11 (2016).

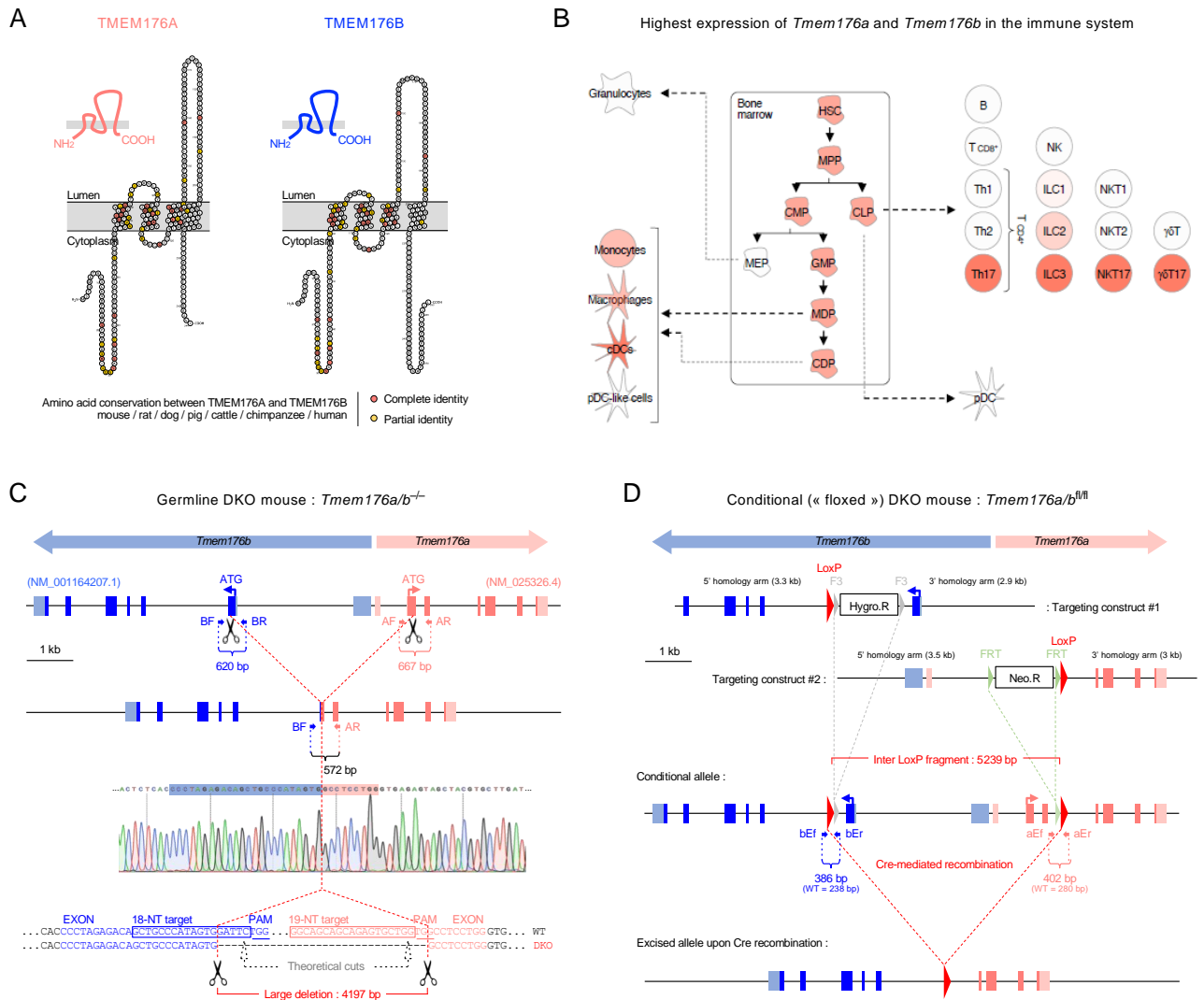


Figure 1. Generation of *Tmem176a/b* double-deficient mice. (A) Graphical topology of mouse TMEM176A and TMEM176B using Protter. The most conserved amino acids between both molecules and across multiple species are highlighted and mainly concentrate within the three first transmembrane domains and in the N-terminal region. (B) Synthetic view of *Tmem176a* and *Tmem176b* expression in immune cells summarized from the literature and public databases (Figure S1). Dark red represents the highest expression. (C) Generation of germline *Tmem176a/b* double KO (DKO) mice carrying a large deletion using a dual CRISPR–Cas9 strategy. *Tmem176a* and *Tmem176b* genes are oriented in an opposite direction in the same genomic locus and share analogous intron-exon organization, with the respective first coding exons only separated by 3.8 kb. Small arrows labeled BR, BR, AF and AR show the position of the primers used for PCR genotyping of the mutant mice. Exons are shown as filled boxes and untranslated regions as shaded boxes. (D) Generation of conditional *Tmem176a/b* DKO mice. Small arrows labeled bEf, bEr, aEf and aEr show the position of the primers used for PCR genotyping of the mutant mice.

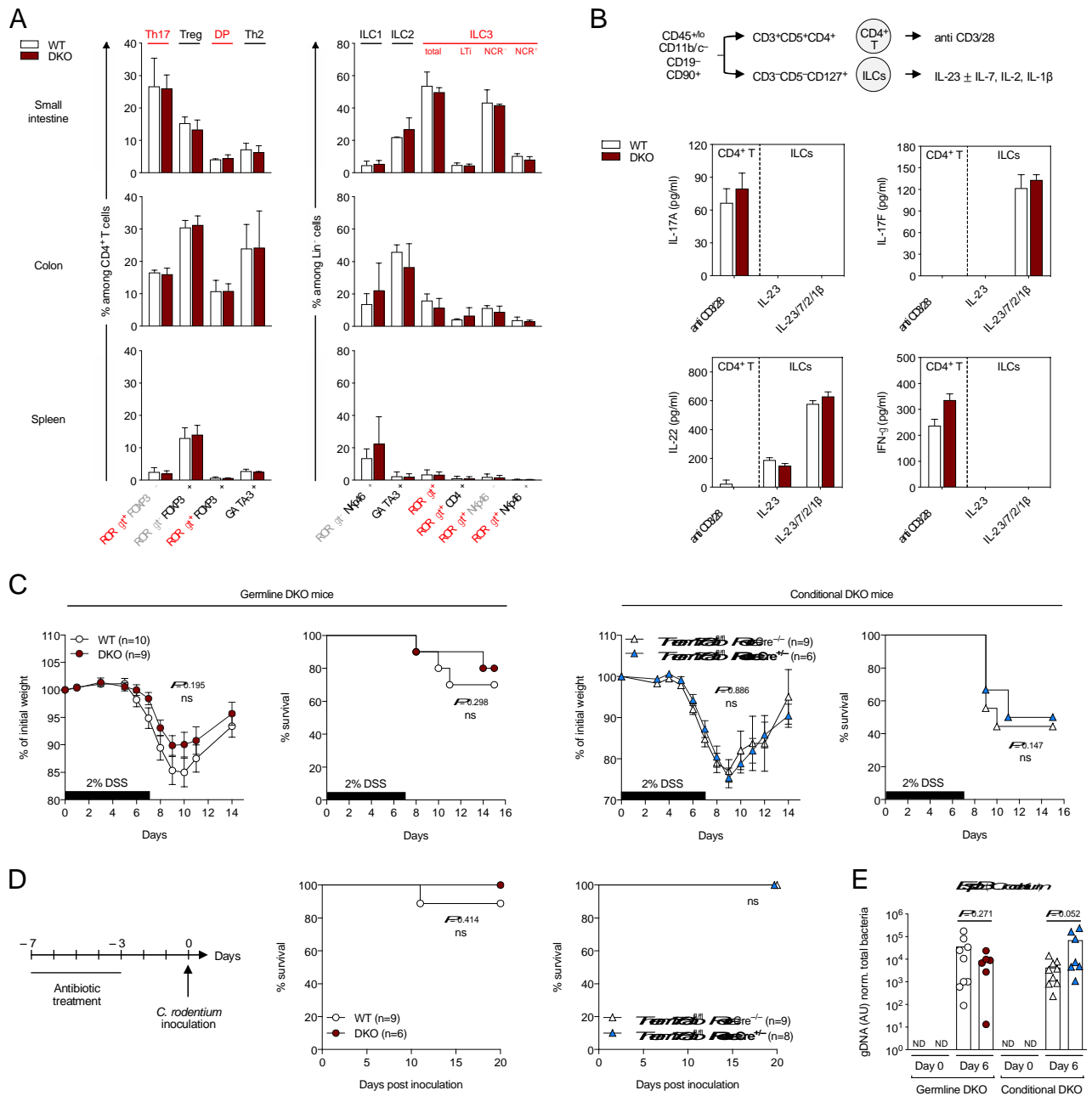


Figure 2. Th17 and ILC3 frequencies and ROR γ ⁺-cell protective functions in the gut mucosa of *Tmem176a/b* double-deficient mice. (A) Relative frequencies of the indicated populations in the small intestine (siLP), colon (cLP) lamina propria and spleen of WT and *Tmem176a/b* DKO littermate mice. Data shown are means (\pm SD) of three independent experiments. (B) In vitro cytokine secretion by CD4⁺ T cells and ILCs FACS-sorted from the intestinal lamina propria of WT and *Tmem176a/b* DKO littermate mice following in vitro culture (18 h) with the indicated stimuli. Data shown are means (\pm SD) of triplicates representative of three independent experiments. (C) Acute colitis induced with 2% DSS in drinking water for 7 consecutive days in germline *Tmem176a/b* (left panels) and ROR γ ⁺ cell-restricted conditional (right panels) DKO mice in comparison to control mice. Data are presented as percent of initial weight (\pm SEM) and survival (weight loss >20%). (D) Infection with *C. rodentium* administered orally (2×10^9 CFU) in germline *Tmem176a/b* and ROR γ ⁺ cell-restricted conditional DKO mice in comparison to control mice. (E) Quantification of *C. rodentium* *EspB* gene by qPCR in the faeces prior infection and 6 days post-infection. Bars indicate means and dots represent individual mice. ND : Not detected.

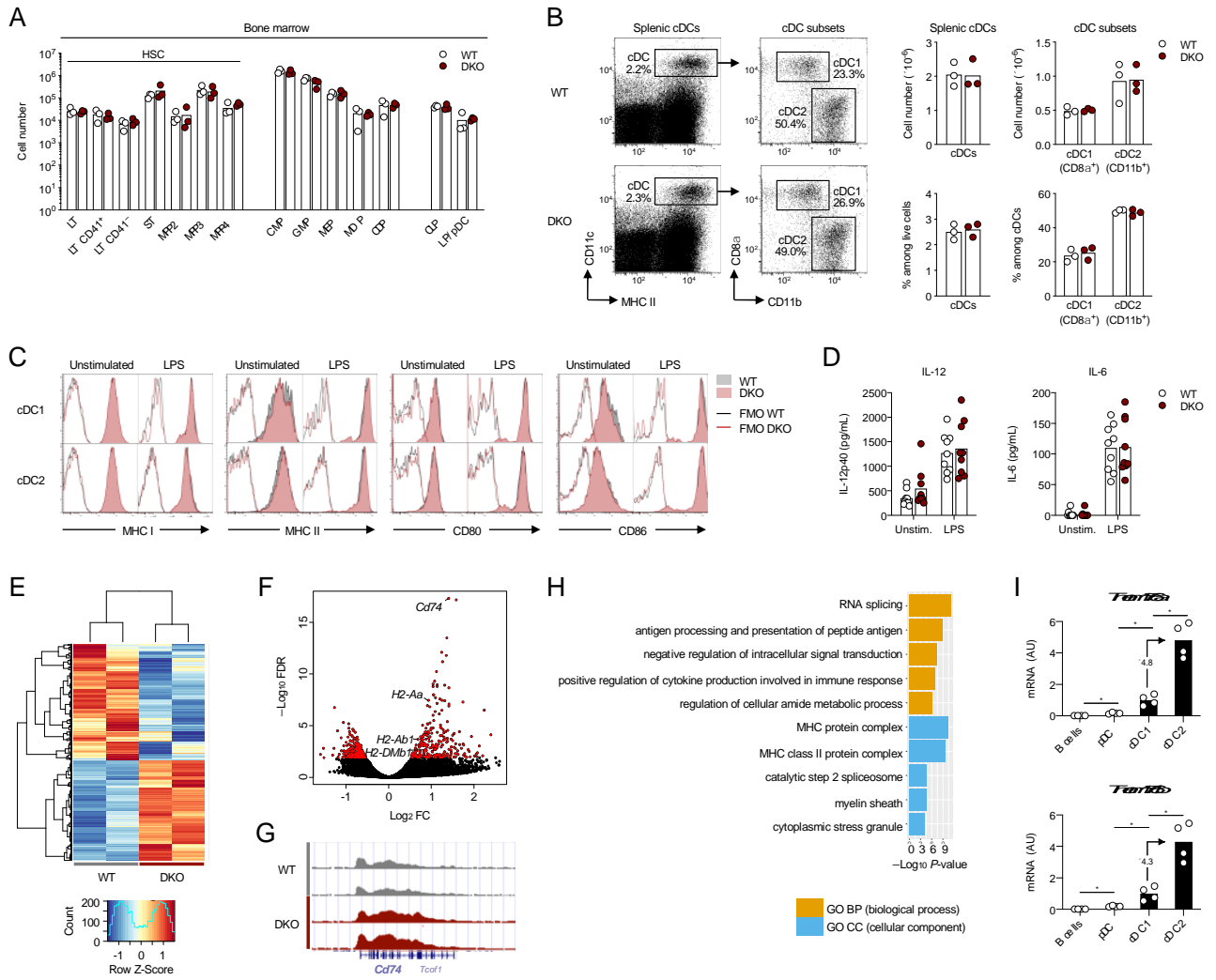


Figure 3. Phenotypic analysis of cDCs in *Tmem176a/b* DKO mice. (A) Hematopoietic stem cell and progenitor numbers in the bone marrow of WT and *Tmem176a/b* DKO mice analyzed by flow cytometry. Bars indicate means and dots represent individual mice. (B) Gating strategy (left panels) and quantification (right panels) of splenic cDCs and subsets from WT and *Tmem176a/b* DKO littermate mice by flow cytometry. Bars indicate means and dots represent individual mice. Data were pooled from three independent experiments. (C) Expression of MHC I, MHC II, CD80 and CD86 molecules at the surface of splenic cDC1 and cDC2 from WT and *Tmem176a/b* DKO littermate mice. Cells were analyzed by flow cytometry freshly after cell preparation or upon LPS stimulation for 6 h in vitro. Shown histograms data are representative of three independent experiments. FMO: Fluorescence minus one. (D) IL-12 and IL-6 secretion by purified cDCs purified from the spleen of WT and *Tmem176a/b* DKO littermate mice and cultured for 16 h with or without LPS. Data were pooled from three independent experiments. (E) Heatmap showing unsupervised clustering z-scores of the differentially acetylated (DA) peaks between WT and DKO splenic cDCs. (F) Volcano plot of the 962 DA peaks (red). Relevant genes linked to MHC class II pathway are highlighted. (G) Genome browser of *Cd74*, hyperacetylated in DKO. (H) Gene ontology of the 445 DA peaks up-regulated in DKO vs WT. (I) Expression of *Tmem176a* and *Tmem176b* assessed by RT-qPCR in the indicated populations FACS-sorted from the spleen. Bars indicate means and dots represent individual mice.

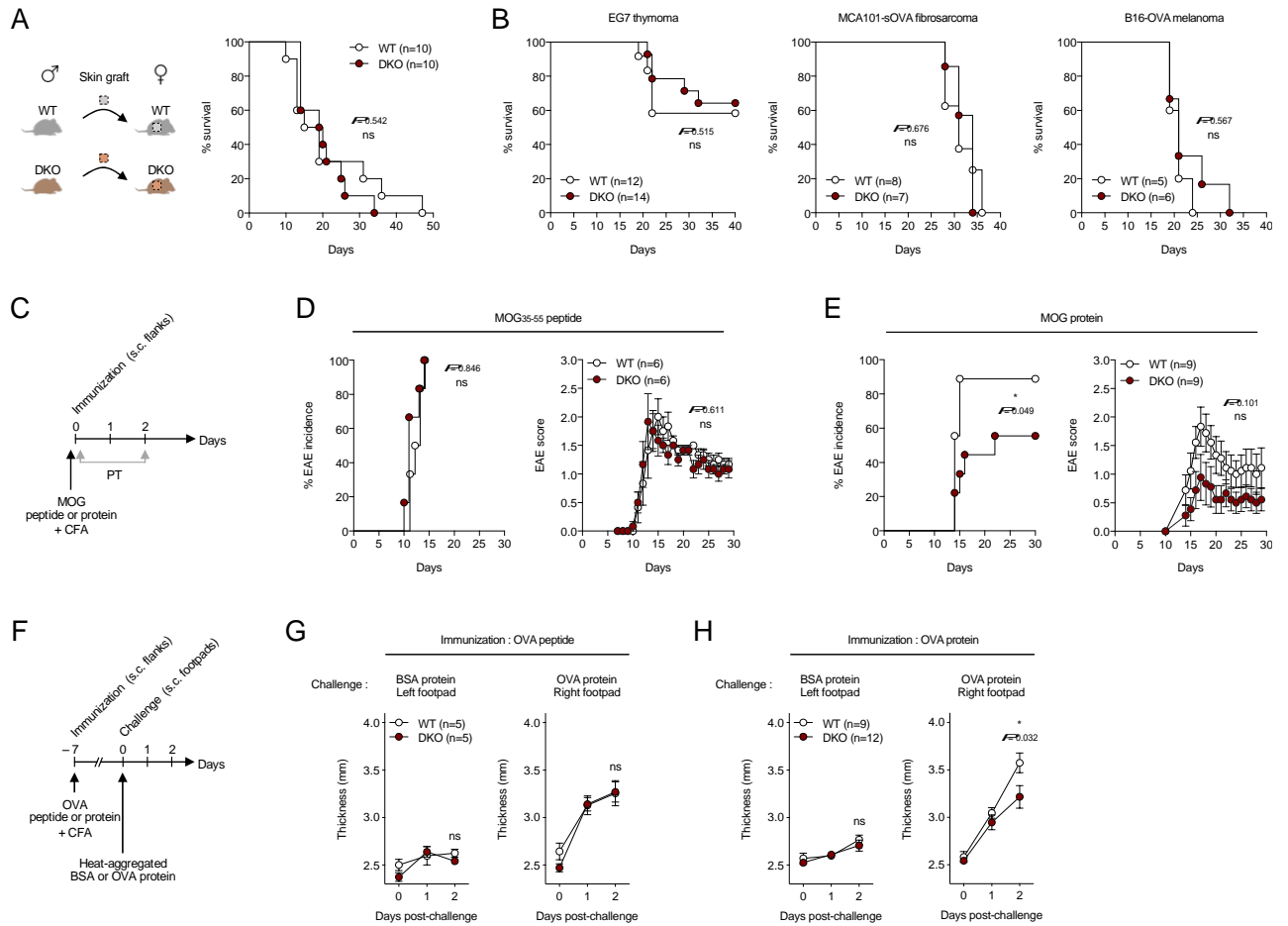


Figure 4. Evaluation of CD8⁺ and CD4⁺ T cell-dependent models in *Tmem176a/b* DKO mice. (A). Rejection rates of male skin graft transplanted onto female WT and *Tmem176a/b* DKO mice. Donor and recipient mice were matched for the presence or absence of *Tmem176a/b*. (B) Survival curves of WT and *Tmem176a/b* DKO mice injected with EG7, MCA101-sOVA or B16-OVA tumor cell line. (C) Schematic representation of EAE induction using MOG₃₅₋₅₅ peptide or MOG₁₋₁₂₅ protein. PT : Pertussis toxin. (D) EAE incidence and score (means±SEM) in WT and *Tmem176a/b* DKO mice using MOG₃₅₋₅₅ peptide for immunization. (E) EAE incidence and score (means±SEM) in WT and *Tmem176a/b* DKO mice using MOG₁₋₁₂₅ protein for immunization. (F) Schematic representation of DTH response using OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide or whole OVA protein for immunization. (G) Left (control) and right footpad swelling (means±SEM) upon injection with the indicated heat-aggregated proteins in WT and *Tmem176a/b* DKO mice using OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide for immunization. (H) Left (control) and right footpad swelling (means±SEM) upon injection with the indicated heat-aggregated proteins in WT and *Tmem176a/b* DKO mice using whole OVA protein for immunization.

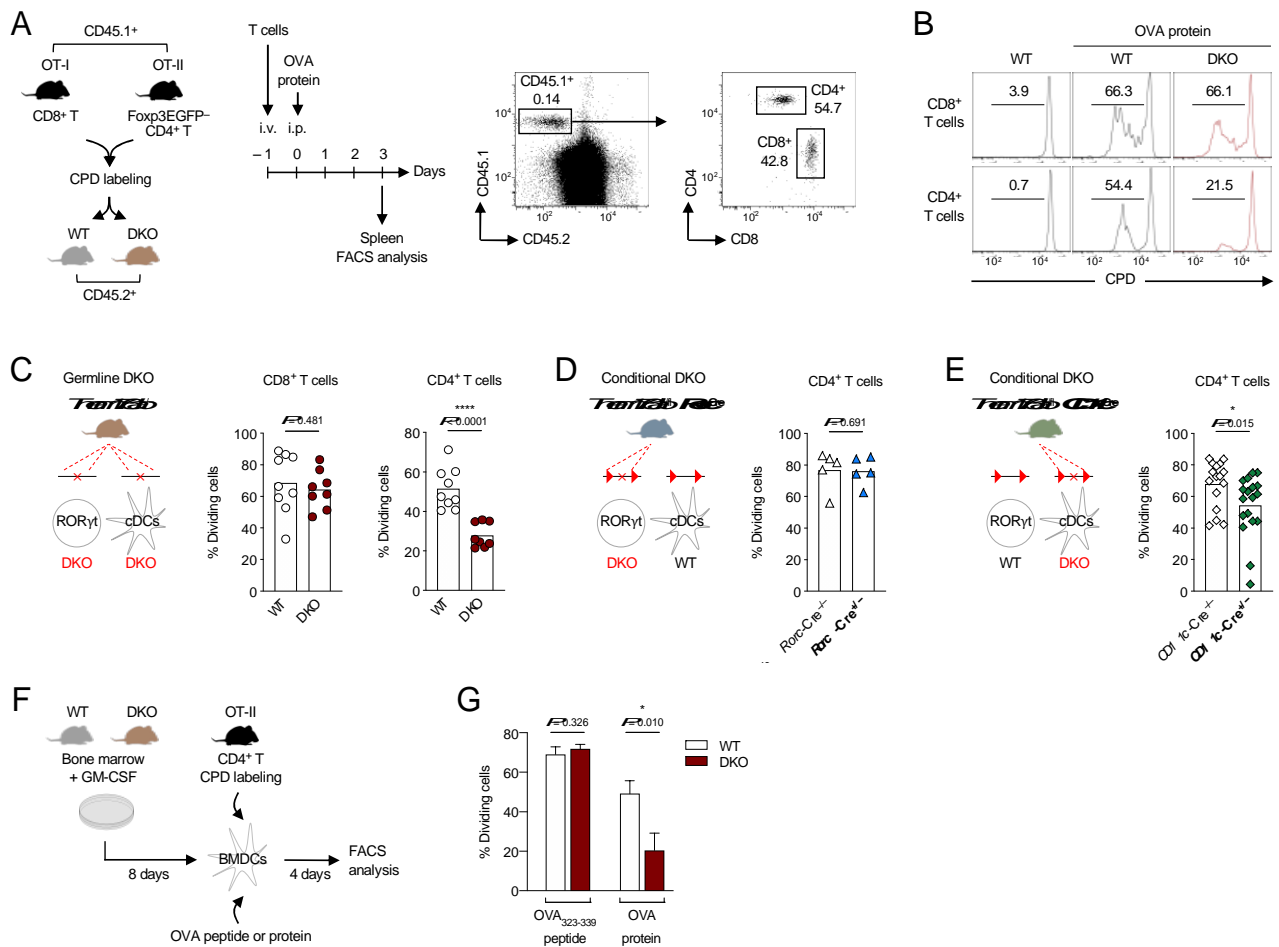


Figure 5. MHC I and II-mediated antigen presentation to T cells by *Tmem176a/b* DKO DCs. (A) Schematic representation of the in vivo antigen-specific T cell proliferation assay and gating strategy for tracking the injected OVA-specific T cells by flow cytometry. CPD : cell proliferation dye. (B) Representative histograms showing the level of proliferation (reflected by CPD dilution) of the OVA-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells following OVA protein injection in WT and *Tmem176a/b* DKO mice. (C) Quantification of OVA-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell proliferation in WT and *Tmem176a/b* DKO mice. (D-E) Quantification of OVA-specific CD4⁺ T cell proliferation in RORγt⁺ cell-restricted (D) or CD11c⁺ cell-restricted (E) conditional DKO mice. Bars indicate means and dots represent individual mice. Data were pooled from at least two independent experiments. (F) Schematic representation of the in vitro antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation assay using BMDCs as antigen-presenting cells. (G) Quantification of CD4⁺ T cell proliferation following incubation of BMDCs from WT and *Tmem176a/b* DKO mice with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide or whole OVA protein. Data shown are means (±SD) of triplicates and are representative of two independent experiments.

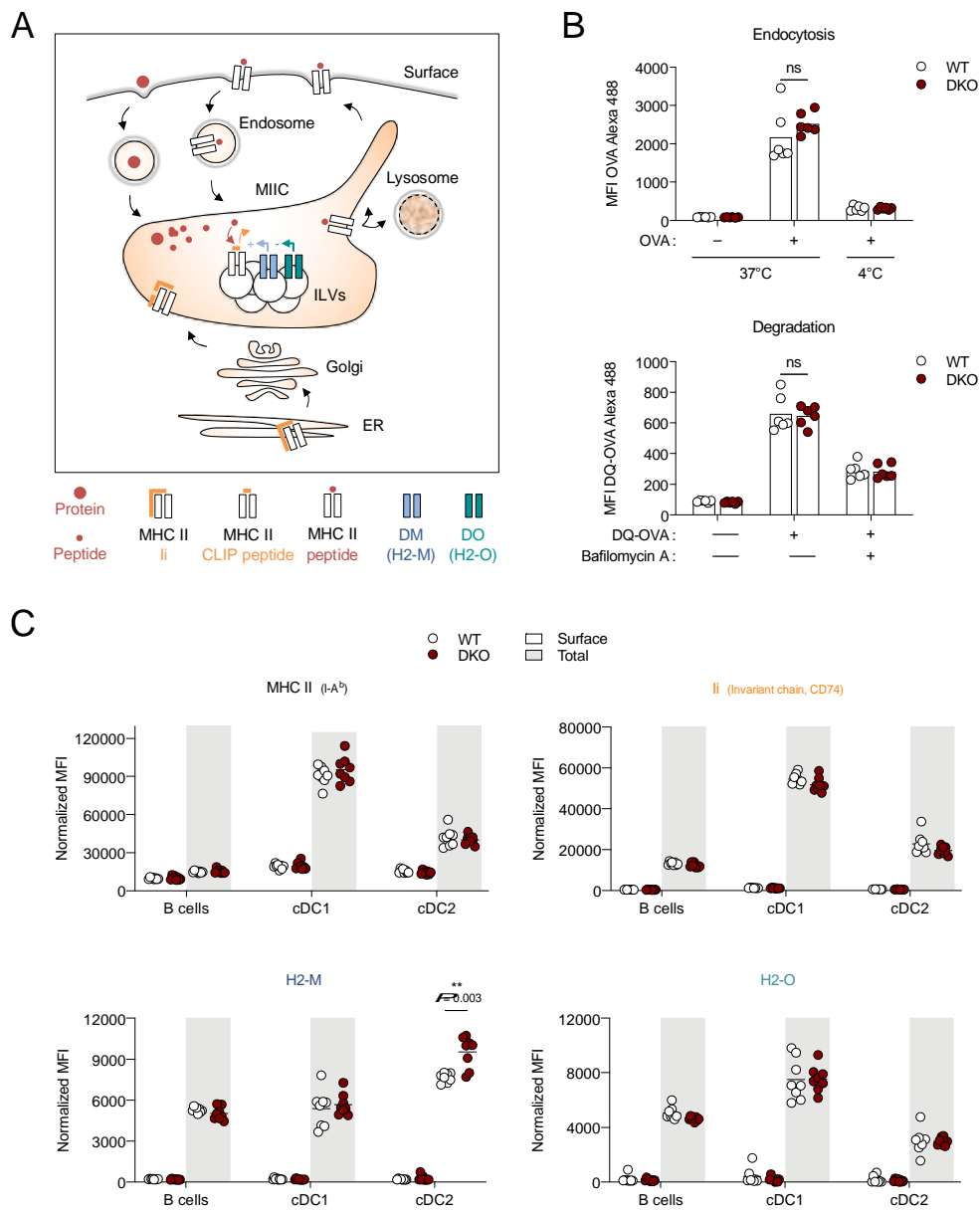


Figure 6. Antigen processing and expression of MHC II-associated molecules in *Tmem176a/b* DKO DCs. (A) Schematic overview of the MHC II pathway. The late endocytic compartment in which MHC II peptide loading occurs is referred to as the MHC II compartment (MIIC). Newly synthesized MHC II molecules in the endoplasmic reticulum (ER) bind to the invariant chain (Ii or CD74) that prevents premature loading with endogenous peptides before HLA-DM (H2-M in mouse) catalyzes the release of the class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in the MIIC. Another MHC II-like protein, HLA-DO (H2-O in mouse), may add another level of regulation by inhibiting H2-M. ILVs : intraluminal vesicles. (B) In vitro antigen uptake and degradation by spleen cDCs from WT and *Tmem176a/b* DKO mice using Alexa 488-coupled OVA and DQ-OVA (that emits fluorescence upon degradation), respectively. Bars indicate means and dots represent individual mice. (C) Surface (white area) and intracellular (total, grey area) expression of MHC II, Ii, H2-M ($\alpha\beta 2$ dimer) and H2-O (β chain) molecules in B cells, cDC1 and cDC2 populations from the spleen of WT and *Tmem176a/b* DKO mice. Bars indicate means and dots represent individual mice. Data were pooled from two independent experiments.

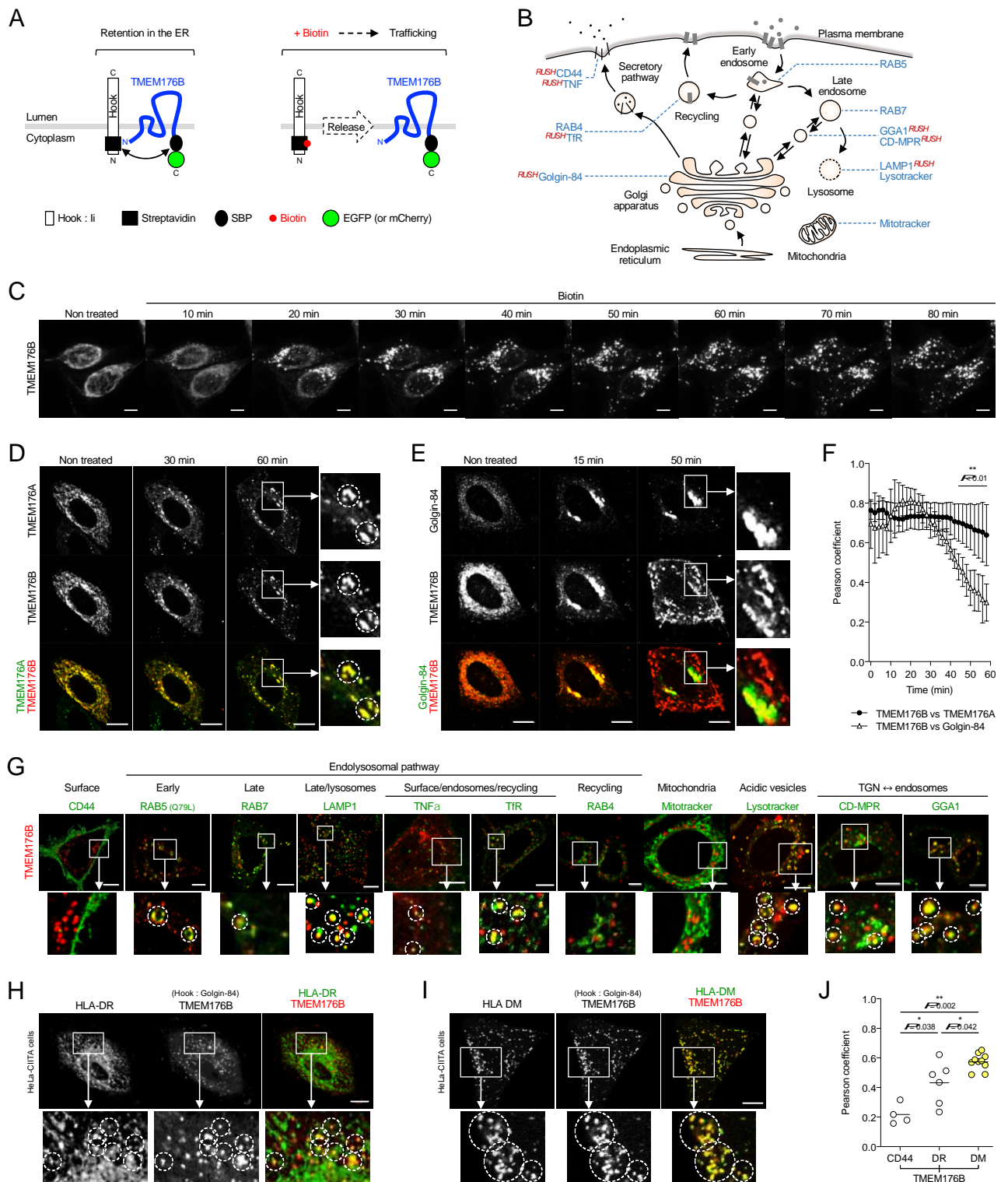


Figure 7. Intracellular trafficking of TMEM176A and TMEM176B using the RUSH system. (A) Principles of the retention using selective hooks (RUSH) system. In the setting we chose to implement for this two-state assay, the protein of interest is fused to the streptavidin binding protein (SBP) and is retained in the donor compartment (here the endoplasmic reticulum, ER) in which the hook (here an isoform of the invariant chain fused to the core streptavidin) remains localized. Synchronous release of the protein of interest is induced by addition of biotin and intracellular trafficking can be monitored by measuring fluorescent tags such as enhanced (E)GFP or mCherry signal by time-lapse

confocal microscopy. **(B)** Schematic representation of the different intracellular compartments and associated markers analyzed. Proteins analyzed using RUSH constructs are indicated **(C)** Micrographs of HeLa cells expressing the TMEM176B-EGFP RUSH construct prior and after addition of biotin. Bar, 10 μm . **(D)** Dual-color analysis using the TMEM176A-EGFP and TMEM176B-mCherry RUSH constructs. Insets show higher magnifications of regions of interest. Circles show examples of colocalized signals. **(E)** Dual-color analysis using the TMEM176B-mCherry and Golgin-84-EGFP RUSH constructs. **(F)** Pearson's correlation coefficients comparing TMEM176B with TMEM176A and Golgin-84 signals. **(G)** Dual-color analysis using the TMEM176B-mCherry or TMEM176B-EGFP RUSH constructs and the indicated genes or probes, >40 min after biotin addition. **(H-I)** Dual-color analysis in HeLa-CIITA cells using the TMEM176B-mCherry RUSH construct with the YFP-associated HLA-DR **(H)** or HLA-DM **(I)** plasmids, >40 min after biotin addition. To avoid interference of the ER-resident mutated form of Ii (in the TMEM176B RUSH construct) on normal dynamic of the MHC II pathway, Ii was replaced by Golgin-84 as a hook in a new construct. To compensate for the low transfection efficiency of the DR/DM constructs, YFP⁺ cells were FACS-sorting 24 h before imaging. **(J)** Pearson's correlation coefficients comparing TMEM176B with CD44, HLA-DR and HLA-DM signals. Each dot represents an individual cell.

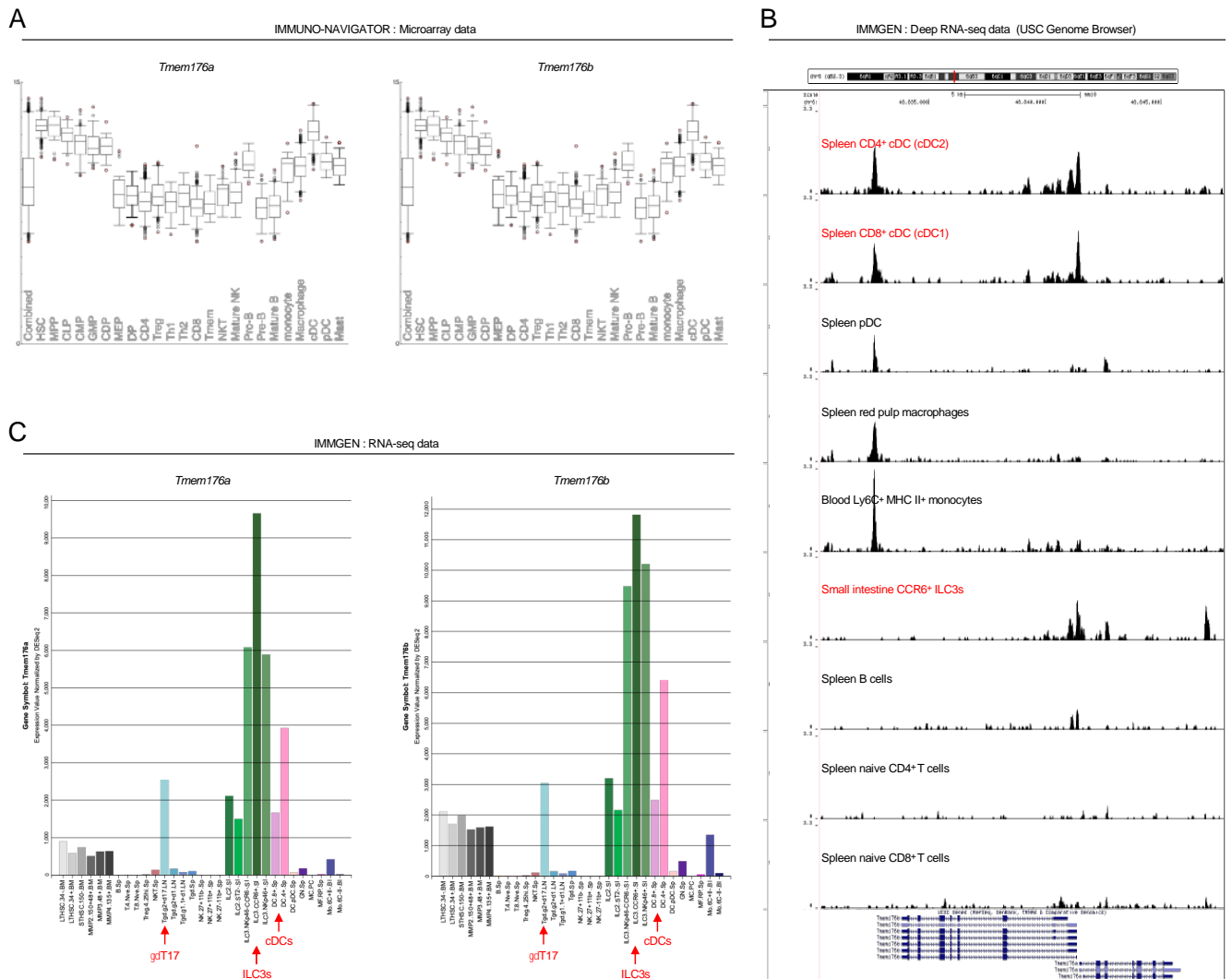


Figure S1. *Tmem176a* and *Tmem176b* expression in the immune system. mRNA expression in different panels of purified immune cells from Immuno-Navigator microarray data (A) (<https://genomics.virus.kyoto-u.ac.jp/immuno-navigator/>), Immgen (<http://www.immgen.org/>) RNA-seq (B) and deep mRNA-seq (C) data. The populations exhibiting the highest relative expression are highlighted in red. HSC : hematopoietic stem cells, MPP : multipotent progenitors, CLP : common lymphoid progenitors, CMP : common myeloid progenitors, GMP : granulocyte-macrophage progenitors, CDP : common dendritic progenitors, MEP : megakaryocyte-erythroid progenitors, DP : Thymic double positive cells, CD4 : CD4⁺ T cells, Th1 : T helper 1, Th2 : T helper 2, CD8 : CD8⁺ T cells, Tmem : memory T cells, NKT : natural killer T cells, Mature NK : mature natural killer cells, cDC : conventional dendritic cells, pDC : plasmacytoid dendritic cells, Mast : Mastocytes.

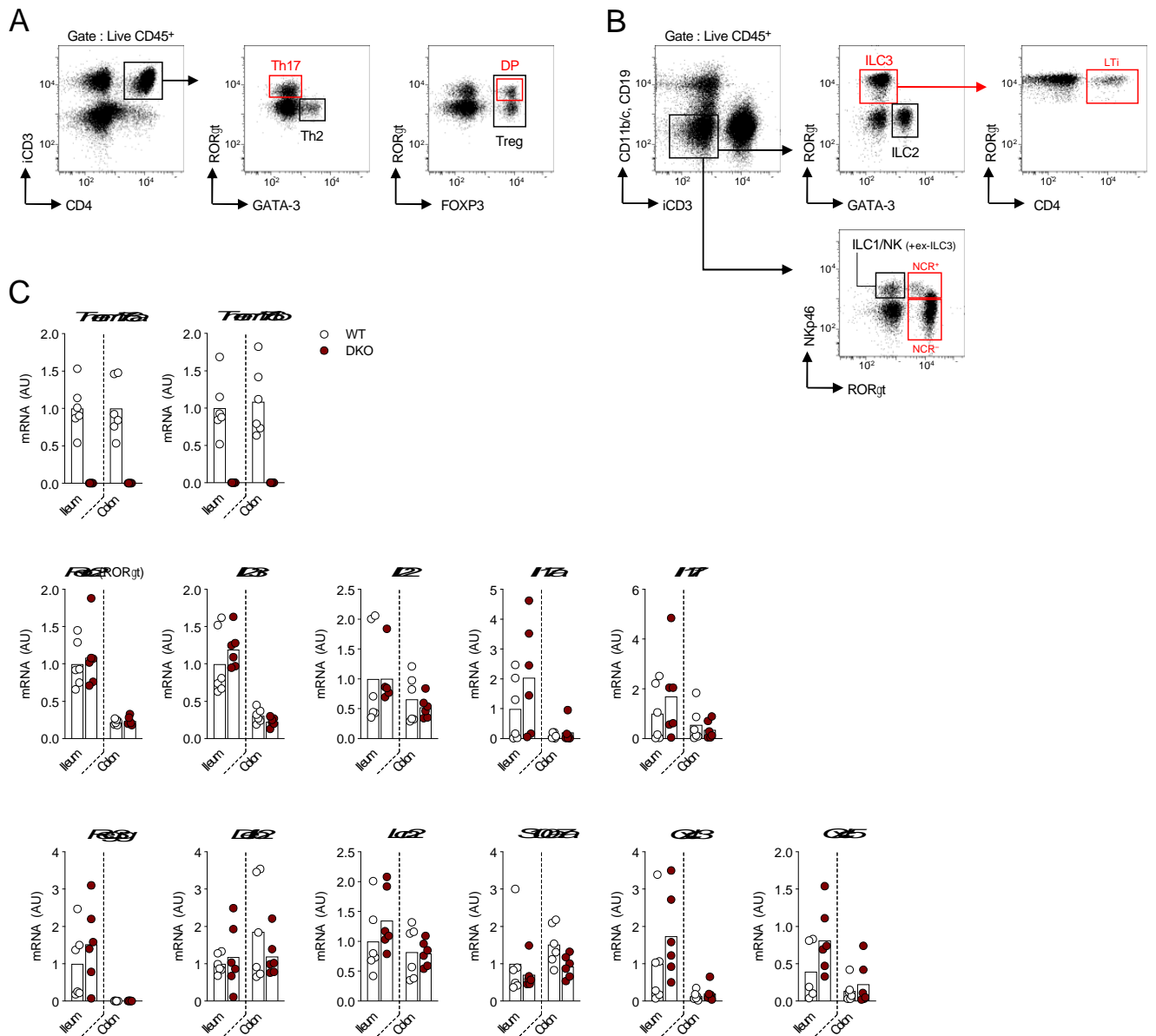


Figure S2. Gating strategy for T cell and ILC FACS analysis and gene expression analysis by RT-qPCR analysis. (A-B) Gating strategy for the analysis (shown in Figure 2A) of T (A) and ILC (B) subsets in the small intestine (siLP), colon (cLP) lamina propria and spleen by flow cytometry. Shown are examples of WT siLP analysis. iCD3 indicates that the anti-CD3 ϵ staining was performed intracellularly along with the transcription factor stainings. DP : double positive cells, NCR : natural-cytotoxicity-receptor cells, LTI : lymphoid-tissue-inducer cells. (C) RT-qPCR analysis of *Tmem176a*, *Tmem176b*, ROR γ t-related genes and IL-22/IL-17 target genes in the ileum and colon of *Tmem176a/b* DKO mice. Pieces of ileum and colon were collected from WT and *Tmem176a/b* DKO mice and total RNA was extracted for RT-qPCR relative expression analysis of the indicated genes. Bars indicate means and dots represent individual mice.

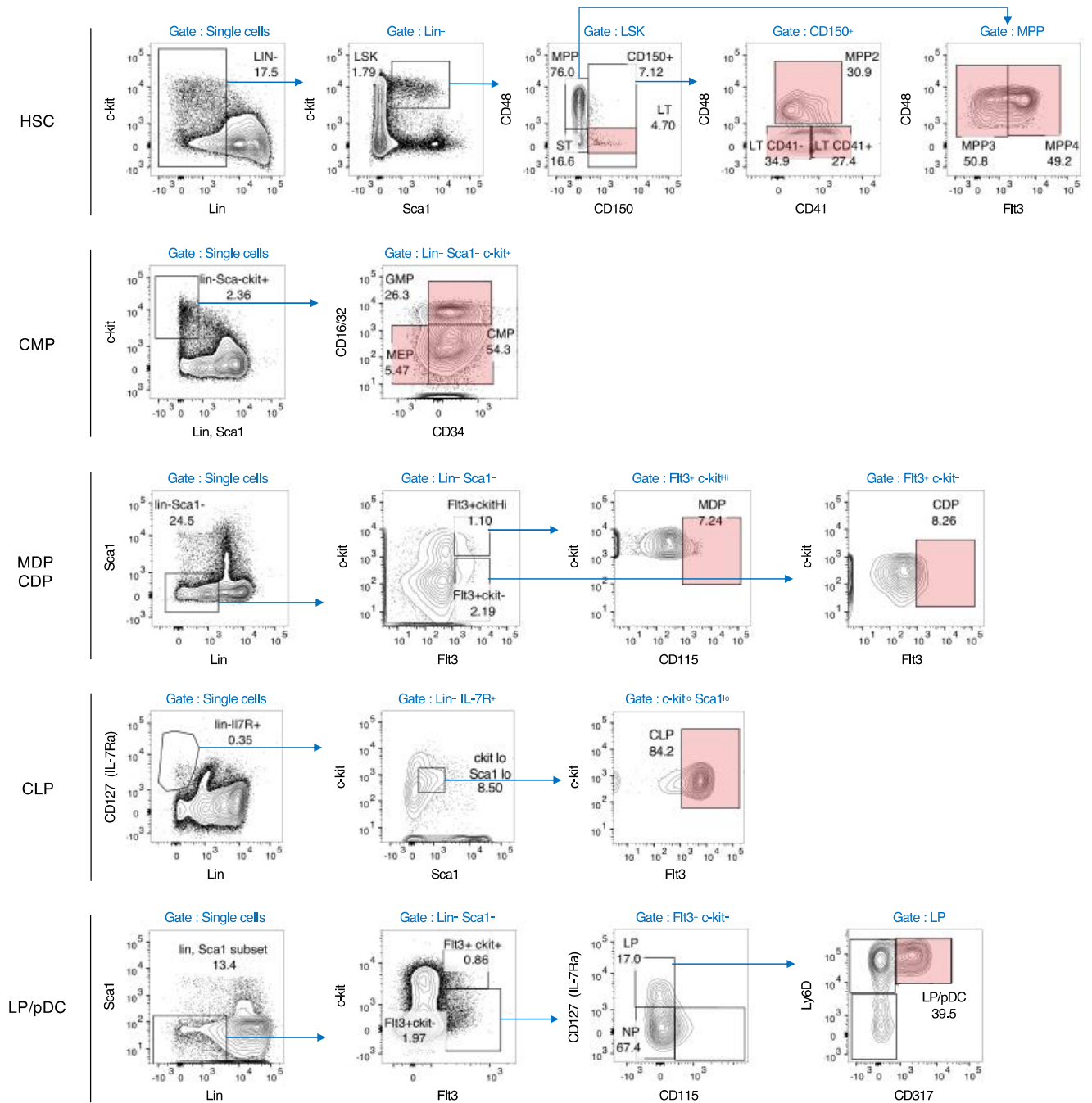


Figure S3. Gating strategy for bone-marrow progenitor analysis by flow cytometry. Gates highlighted in red indicate the progenitor populations (schematically represented in Figure 1B) that were quantified in WT and *Tmem176a/b* DKO mice (shown in Figure 3A).

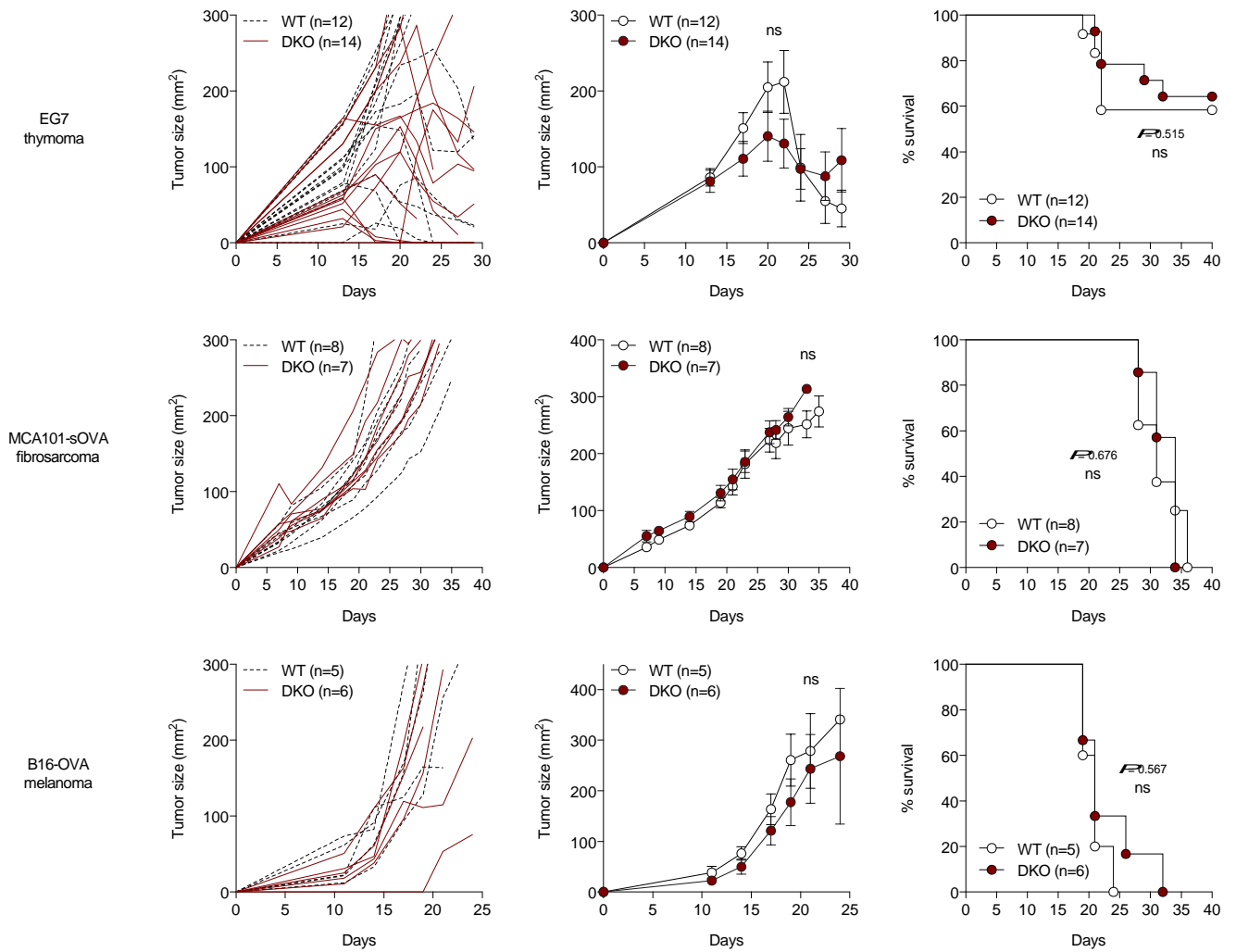


Figure S4. Tumor growth and survival in *Tmem176a/b* DKO mice. For each indicated tumor cell line, tumor growth in WT and *Tmem176a/b* DKO mice is shown in individual mice and as mean (\pm SEM) in addition to survival rate (as shown in Figure 4B).

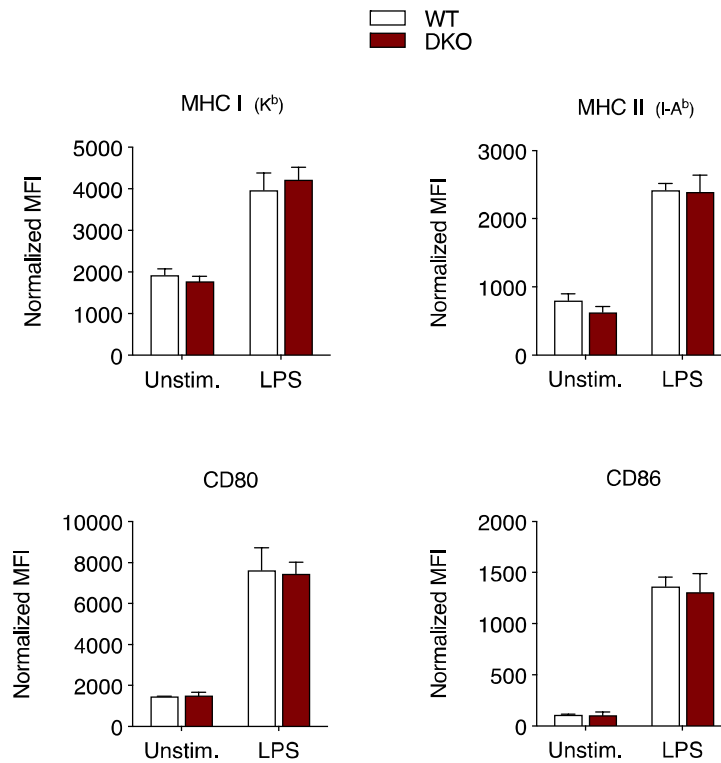


Figure S5. Phenotypic analysis of unstimulated and LPS-stimulated *Tmem176a/b* DKO BMDCs. Expression of MHC I, MHC II, CD80 and CD86 molecules at the surface of BMDCs generated from WT and *Tmem176a/b* DKO littermate mice. Cells were analyzed by flow cytometry after a culture (6 h) with or without 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS. Data shown are means ($\pm\text{SD}$) of triplicates representative of three independent experiments.

Video S1. Real-time imaging of the synchronized trafficking of TMEM176B using the RUSH system (corresponds to Figure 7C). After 20 h of expression, at time 00:00, release of the reporter TMEM176B-SBP-EGFP was induced by addition of biotin and monitored using a spinning disk confocal microscope.

Lien: https://www.dropbox.com/sh/6kl4yzc0wajwh4o/AAAcnTPefanl3CdQc7IncU_5a?dl=0

Video S2. Dual color, real-time imaging of the synchronized trafficking of TMEM176B and TMEM176A using the RUSH system (corresponds to Figure 7D). After 20 h of expression, at time 00:00, release of the reporters TMEM176B-SBP-mCherry (red) and TMEM176A-SBP-EGFP (green) was induced by addition of biotin and monitored using a confocal microscope.

Video S3. Dual color, real-time imaging of the synchronized trafficking of TMEM176B and TMEM176A using the RUSH system (corresponds to Figure 7E). After 20 h of expression, at time 00:00, release of the reporters TMEM176B-SBP-mCherry (red) and Golgin-84-SBP-EGFP (green) was induced by addition of biotin and monitored using a confocal microscope.

Table S1. Antibodies used in this study.Lancien *et al.***Antibodies used in this study****(intra)** indicates that the antibody was used following a fixation/permeabilisation step to allow intracellular staining**Figure 2A-C : CD4⁺ T cell and ILC analysis****CD4⁺ T cells**

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD45.2	104	APC-Cy7	BD Biosciences
CD4	RM4-5	V450	BD Biosciences
CD8a	53-6.7	PE-Cy7	BD Biosciences
CD3e (intra)	145-2C11	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
RORgt (intra)	Q31-378	Alexa Fluor 647	BD Biosciences
GATA-3 (intra)	TWAJ	Alexa Fluor 488	eBioscience
FOXP3 (intra)	FJK16S	PE	eBioscience

ILCs

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD45.2	104	APC-Cy7	BD Biosciences
CD11b	M1/70	PE	BD Biosciences
CD11c	HL3	PE	BD Biosciences
CD19	1D3	PE	BD Biosciences
CD3e (intra)	145-2C11	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
RORgt (intra)	Q31-378	Alexa Fluor 647	BD Biosciences
GATA-3 (intra)	TWAJ	Alexa Fluor 488	eBioscience
CD4	RM4-5	PE-Cy7	BD Biosciences
NKp46 (CD335)	29A1.4	eFluor 450	eBioscience

Figure 2D : Intestinal CD4⁺ T cell and ILC FACS-sorting for in vitro assay

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD45.2	104	APC-Cy7	BD Biosciences
CD11b	M1/70	PE	BD Biosciences
CD11c	HL3	PE	BD Biosciences
CD19	1D3	APC	BD Biosciences
CD90.2	53-2.1	eFluor 450	eBioscience
CD3e	145-2C11	FITC	BD Biosciences
CD5	53-7.3	FITC	BD Biosciences
CD4	RM4-5	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
CD127	SB/199	PE-Cy7	BD Biosciences

Figure 3A (and S3) : HSC and progenitor analysis

HSC

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD3	145-2C11	Biotin	BD Biosciences
CD4	GK1.5	Biotin	BD Biosciences
CD11b	M1/70	Biotin	BD Biosciences
CD11c	N418	Biotin	BioLegend
CD19	6D5	Biotin	BioLegend
B220	RA3-6B2	Biotin	BD Biosciences
Gr-1	RB6-8C5	Biotin	BD Biosciences
CD49b	DX5	Biotin	BioLegend
Ter119	Ter119	RB6-8C5	BD Biosciences
CD8	53-6.7	Biotin	BioLegend
Streptavidin	-	eFluor 710	eBioscience
c-kit	2B8	APC	BioLegend
Sca1	D7	PE-Cy7	BD Biosciences
CD48	HM48-1	FITC	BioLegend
CD150	TC15-12F12.2	BV421	BioLegend
Flt3	A2F10	PE	eBioscience
CD41	MWRReg30	BV510	BioLegend

Lineage

CMP/MEP/GMP

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD3	145-2C11	Biotin	BD Biosciences
CD4	GK1.5	Biotin	BD Biosciences
CD11b	M1/70	Biotin	BD Biosciences
CD11c	N418	Biotin	BioLegend
CD19	6D5	Biotin	BioLegend
B220	RA3-6B2	Biotin	BD Biosciences
Gr-1	RB6-8C5	Biotin	BD Biosciences
CD49b	DX5	Biotin	BioLegend
Ter119	Ter119	Biotin	BD Biosciences
CD8	53-6.7	Biotin	BioLegend
Sca1	D7	Biotin	eBioscience
Streptavidin	-	Alexa Fluor 405	Life technologies
CD34	MEC14.7	PE	BioLegend
c-kit	2B8	APC	BioLegend
CD16/32	2.4G2	PE-Cy7	BioLegend

Lineage

MDP/CDP/CLP

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD3	145-2C11	Biotin	BD Biosciences
CD4	GK1.5	Biotin	BD Biosciences
CD11b	M1/70	Biotin	BD Biosciences
CD11c	N418	Biotin	BioLegend
CD19	6D5	Biotin	BioLegend
B220	RA3-6B2	Biotin	BD Biosciences
Gr-1	RB6-8C5	Biotin	BD Biosciences
CD49b	DX5	Biotin	BioLegend
Ter119	Ter119	Biotin	BD Biosciences
CD8	53-6.7	Biotin	BioLegend
Streptavidin	-	Alexa Fluor 405	Life technologies
Flt3	A2F10	PE	eBioscience
c-kit	2B8	APC-Cy7	BioLegend
CD115	AFS98	APC	eBioscience
CD127	A7-R34	PE-Dazzle594	BioLegend
Sca1	D7	PE-Cy7	BD Biosciences

Lineage

LP/pDC

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD3	145-2C11	Biotin	BD Biosciences
CD4	GK1.5	Biotin	BD Biosciences
CD11b	M1/70	Biotin	BD Biosciences
CD11c	N418	Biotin	BioLegend
CD19	6D5	Biotin	BioLegend
B220	RA3-6B2	Biotin	BD Biosciences
Ly6C (CD59)	ER-MP20	Biotin	BMA Biomedicals
Gr-1	RB6-8C5	Biotin	BD Biosciences
NK1.1	PK136	Biotin	BioLegend
Ter119	Ter119	Biotin	BD Biosciences
CD8	53-6.7	Biotin	BioLegend
Streptavidin	-	eFluor 710	eBioscience
CD115	AFS98	APC	eBioscience
c-kit	2B8	APC-Cy7	BioLegend
Sca1	D7	BUV395	BD Biosciences
CD127	A7-R34	PE-Dazzle594	BioLegend
Flt3	A2F10	BV421	BioLegend
Ly6D	49-H4	PE	BioLegend
CD317	ebio927	Alexa Fluor 488	eBioscience

Lineage

Figure 3B-C : cDC phenotypic analysis

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD11c	HL3	PE-Cy7	BD Biosciences
CD8a	53-6.7	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
CD11b	M1/70	APC-Cy7	BD Biosciences
I-A ^b (MHC II)	AF6-120.1	eFluor 450	eBioscience
H-2Kb (MHC I)	AF6-88.5	Alexa Fluor 647	BD Biosciences
CD80 (B7-1)	16-10A1	PE	BD Biosciences
CD86 (B7-2)	GL1	FITC	BD Biosciences

Figure 5A-E : T cell FACS-sorting and analysis**CD4⁺ T cells FACS-sorting from OT-II.Ly5.1.Foxp3EGFP mice**

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD4	RM4-5	PE-Cy7	BD Biosciences

In vivo CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation analysis (dilution of eFluor 670 CPD)

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD45.1	A20	APC-Cy7	BD Biosciences
CD45.2	104	PE	BD Biosciences
CD4	RM4-5	V450	BD Biosciences
CD8a	53-6.7	PE-Cy7	BD Biosciences

Figure 5F-G : In vitro CD4⁺ T cell proliferation analysis

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD4	RM4-5	PE-Cy7	BD Biosciences

Figure 6B : Endocytosis/degradation assays

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD11c	HL3	PE-Cy7	BD Biosciences
CD8a	53-6.7	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
CD11b	M1/70	APC-Cy7	BD Biosciences
I-A ^b (MHC II)	AF6-120.1	eFluor 450	eBioscience

Figure 6C : Surface and total (intra) expression of MHC II-associated molecules

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD45R (B220)	RA3-6B2	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
CD11c	N418	BV421	BD Biosciences
CD11bA:BA:CA:DA:EA:D	M1/70	APC-Cy7	BD Biosciences
CD8a	53-6.7	PE-Cy7	BD Biosciences
I-A ^b (MHC II)	AF6-120.1	FITC	BD Biosciences
CD74	In-1	FITC	BD Biosciences
H2-Ob	Mags.Ob1	Alexa Fluor 647	Lisa Denzin
H2-M	2E5A	Purified	BD Biosciences
Anti rat IgG1 (for H2-M)	RG11/39.4	FITC	BD Biosciences

Figure S5 : BMDC phenotypic analysis

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
I-A ^b (MHC II)	AF6-120.1	eFluor 450	eBioscience
H-2Kb (MHC I)	AF6-88.5	Alexa Fluor 647	BD Biosciences
CD80 (B7-1)	16-10A1	PE	BD Biosciences
CD86 (B7-2)	GL1	FITC	BD Biosciences

Figure S6 : Analysis of neutrophils and CD4⁺ T cell activation/proliferation status**CD4⁺ T cells and neutrophils**

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32	2.4G2	-	BD Biosciences
CD4	RM4-5	V450	BD Biosciences
CD62L	MEL-14	FITC	BD Biosciences
CD44	IM7	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
Ki-67 (intra)	SoIA15	eFluor 660	eBioscience
CD11b	M1/70	PE-Cy7	BD Biosciences
Ly6G	1A8	PE	BD Biosciences

Intracellular IFN γ and IL-17A expression in CD4⁺ T cells upon PMA-ionomycin stimulation

Specificity	Clone	Fluorochrome or biotin	Source
CD16/32 (intra)	2.4G2	-	BD Biosciences
CD3e (intra)	145-2C11	FITC	BD Biosciences
CD4 (intra)	RM4-5	V450	BD Biosciences
IFN-g (intra)	XMG1.2	PE	BD Biosciences
IL-17A (intra)	TC11-18H10	Alexa Fluor 647	BD Biosciences

Table S2. Oligonucleotides used in this study.

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)
<i>EspB</i> (<i>C.Rodentium</i>)	ATGCCGCAGATGAGACAGTTG	CGTCAGCAGCCTTTTCAGCTA	141
16S total bacteria	GGTGAATACGTTCCCGG	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	144
<i>Tmem176a</i>	CAAACCTTCTGCTGGCCGAT	GTGAAGGAAGGCAACAGCTC	238
<i>Tmem176b</i>	AAGAAGTTTCTCTCCTGGCCT	CAGTTTTCCCTGCCTCTTCTCA	222
<i>Rorc2</i>	GGAGGACAGGGAGCCAAGTT	AGTAGGCCACATTACACTGCT	160
<i>Il23r</i>	GCAACATGACATGCACCTGG	TGTTGTGAGTTCTCCATGCCT	208
<i>Il22</i>	CCTACATGCAGGAGGTGGTG	AAACAGCAGGTCCAGTTCCC	176
<i>Il17a</i>	AGTCCAGGGAGAGCTTCATCT	TCTTCATTGCGGTGGAGAGTC	248
<i>Il17f</i>	GAAGTGCACCCGTGAAACAG	AACTGGAGCGGTTCTGGAAT	230
<i>Reg3g</i>	CAGATATGGCCTGCCAAAAGA	TGTTGGGTTTCATAGCCCAGTG	159
<i>Defb2</i>	CTGGAGTCTGAGTGCCCTTTC	CTCCATTGGTGTGGCAGTGG	153
<i>Lcn2</i>	ATGTCACCTCCATCCTGGTC	GCGAACTGGTTGTAGTCCGT	169
<i>S100a7a</i>	CAGACACACCAAGTGGAGGAC	ATGTAGTATGGCTGCCTGCG	169
<i>Cxcl3</i>	CCCAGACAGAAGTCATAGCCAC	CCCAGACAGAAGTCATAGCCAC	193
<i>Cxcl5</i>	GCTGGCATTCTGTTGCTGT	AGTTTAGCTATGACTTCCACCGT	192
<i>Gapdh</i>	GGTGAAGGTCGGTGTGAACGG	TCGCTCCTGGAAGATGTTGAT	232

Table S3. Plasmids used in this study.

RUSH constructs

Protein of interest	Full name of the plasmid	Fluorescent protein	Hook	Source
TMEM176B	Str-ii_TMEM176B-SBP-EGFP	EGFP	li	This study (Cloned using the Str-ii_CD44-SBP-EGFP construct from F.Perez)
TMEM176B	Str-ii_TMEM176B-SBP-mCherry	mCherry	li	This study (Cloned using the Str-ii_CD44-SBP-EGFP construct from F.Perez)
TMEM176B	Str-G84_TMEM176B-SBP-mCherry	mCherry	Golgin-84	This study (Cloned using the Str-ii_CD44-SBP-EGFP construct from F.Perez)
TMEM176A	Str-ii_TMEM176A-SBP-EGFP	EGFP	li	This study (Cloned using the Str-Golgin84_VSVGwt-SBP-EGFP construct from F.Perez)
Golgin-84	Str-ii_SBP-EGFP-Golgin84	EGFP	li	Franck Perez (Institut Curie, Paris, France)
CD44	Str-ii_CD44-SBP-EGFP	EGFP	li	Franck Perez (Institut Curie, Paris, France)
LAMP1	Str-ii_LAMP1-SBP-mCherry	mCherry	li	This study (Cloned using the Str-ii_CD44-SBP-EGFP construct from F.Perez)
TNF α	Str-KDEL_TNF α -SBP-EGFP	EGFP	KDEL	Franck Perez (Institut Curie, Paris, France)
TIR	Str-KDEL_TIR-SBP-EGFP	EGFP	KDEL	Juan S. Bonifacino (NIH, MD, USA)
CD-MPR	Str-KDEL_SP-SBP-EGFP-CD-MPR	EGFP	KDEL	Juan S. Bonifacino (NIH, MD, USA)

Str : Core streptavidin

li : Isoform of human invariant chain (retained in the ER) used as a hook

G84 : Golgin-84 (resident of the Golgi apparatus) used as a hook

SBP : Streptavidin-binding peptide

TIR : Transferrin receptor

CD-MPR : Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor

Other constructs

Protein of interest	Full name of the plasmid	Fluorescent protein	Source
GGA1	GFP-GGA1	EGFP	Juan S. Bonifacino (NIH, MD, USA)
RAB4B	GFP-RAB4B	EGFP	Juan S. Bonifacino (NIH, MD, USA)
RAB5(Q79L)	mCherry-RAB5CA(Q79L)	mCherry	Franck Perez (Addgene Plasmid #35138)
RAB7A	GFP-RAB7A	EGFP	Juan S. Bonifacino (NIH, MD, USA)
HLA-DR β	DR α -DR β -YFP	YFP	This study (Cloned using the DR α -DR β -CFP plasmid from J.Neeffjes)
HLA-DM α	DM β -DM α -YFP	YFP	Jacques Neeffjes (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands)

Discussion

Les canaux ioniques sont des acteurs majeurs de la régulation du système immunitaire. Les cellules immunitaires expriment, en effet, différents canaux ioniques leur permettant de réguler finement l'équilibre ionique et le pH. Ces flux ioniques ont été impliqués dans plusieurs processus cellulaires telles que la régulation du potentiel membranaire et la migration (Feske, Wulff et Skolnik, 2015). De nombreuses études ont mis en avant le rôle majeur du Ca^{2+} dans les processus intracellulaires, notamment avec le canal CRAC et l'importance du mécanisme SOCE dans l'activation des cellules T (Lewis et Cahalan, 1989). Néanmoins, d'autres ions sont également importants tels que le Na^+ , le K^+ , le Cl^- , le Mg^{2+} ou le Zn^{2+} . Par exemple, le Zn^{2+} a un rôle de messenger secondaire et sa concentration intracellulaire est augmentée après l'activation des lymphocytes T par les DCs, *in vitro* (Feske, Wulff et Skolnik, 2015). L'importance des canaux ioniques est mise en évidence par les pathologies associées à leur déficience. Par exemple, la perte de fonction des protéines ORAI1 ou STIM1 a été associée à un déficit immunitaire combiné et également à des symptômes touchant d'autres types cellulaires : une hypotonie musculaire et une dysplasie ectodermique (Vaeth et Feske, 2018). Bien que les canaux ioniques participent à des mécanismes majeurs dans les cellules immunitaires, ils restent peu étudiés.

Néanmoins, plusieurs canaux ioniques présents dans la membrane plasmique des DCs ont été mis en évidence. Par exemple, les canaux le Nav1.7 et CRAC ont été impliqués dans la maturation des DCs humaines (Vandier et Velge-Roussel, 2018). Dans les DCs murines, le canal TRPV1 (transient receptor potential vanilloid-1) est un canal à Ca^{2+} non sélectif. Bien que son expression dans les DCs soit controversée, il apparaît qu'il participerait à la maturation et à l'augmentation des molécules CMH II et CD86 à la surface cellulaire (Sumoza-Toledo, 2014).

En ce qui concerne les cellules ROR γ ⁺, il existe très peu de canaux ioniques strictement spécifiques de ces cellules. Les canaux K^+ participent au maintien du potentiel de membrane. Contrairement aux Th1 et Th2 dans lesquels l'activité des KCa3.1 domine, les Th17 dépendent principalement des canaux Kv1.3 pour l'activation et la production d'IL-17A (Di et al., 2010). De plus, les souris Kv1.3 déficientes se sont révélées résistantes à l'EAE et les cellules T CD4⁺ de ces souris produisent peu d'IFN γ et d'IL-17 et sont moins capables de proliférer (Gocke et al., 2012).

La majorité des canaux ioniques mis en évidence est localisée dans la membrane plasmique. Il existe peu d'études investiguant les canaux ioniques intracellulaires, en particulier en ce

qui concerne les DCs (Vandier et Velge-Roussel, 2018). Pourtant, leur compréhension pourrait mettre en évidence de nouveaux mécanismes de régulation dans les cellules immunitaires.

Notre équipe a mis en évidence en 2005 un gène nommé *Tmem176b*, puis son homologue *Tmem176a*, qui sont exprimés dans les DCs dans un modèle en transplantation (Louvet *et al.*, 2005). L'étude de ces protéines a montré qu'il s'agit de canaux ioniques intracellulaires dont le rôle est inconnu (Segovia *et al.*, 2014; Drujont *et al.*, 2016). La vision que nous avons de ces protéines a été fortement modulée depuis 2012. En effet, l'étude transcriptionnelle des cellules de l'immunité de type 17 a mis en évidence une forte expression des homologues dans les cellules ROR γ ⁺ telles que les Th17 et les ILC3, par exemple (Ciofani *et al.*, 2012; Robinette *et al.*, 2015). Notre équipe a, par la suite, réalisé la première étude comparative de l'expression de *Tmem176a* et *Tmem176b* dans les cellules lymphoïdes de type 1, 2 et 17. Nous avons confirmé l'expression préférentielle des gènes dans les cellules ROR γ ⁺ en comparaison aux autres différenciations (Drujont *et al.*, 2016).

L'objectif de ce projet était de comprendre le rôle de TMEM176A et B dans ces deux types cellulaires. Il est intrigant de comprendre comment deux canaux ioniques homologues peuvent avoir un rôle à la fois dans les cellules ROR γ ⁺ et dans les DCs alors que la fonction respective de ces cellules est très différente.

Pour répondre à cette question, nous avons généré des souris double déficientes pour *Tmem176a* et *Tmem176b*, totales ou conditionnelles. En effet, notre équipe a montré que TMEM176A et B ont une fonction ionique très similaire et que *Tmem176a* est surexprimé dans la souris déficiente pour *Tmem176b* (dans les Th17 (Drujont *et al.*, 2016) et également dans les DCs). Il était donc nécessaire de cibler les deux gènes simultanément pour éviter un phénomène de compensation et l'observation d'un phénotype qui ne serait que partiel. *Tmem176a* et *b* sont exprimés dans plusieurs populations cellulaires en dehors du système immunitaire. Les souris conditionnelles sont donc un outil précieux pour déléter les gènes et comprendre leur rôle dans un type cellulaire particulier.

Quel est le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺?

Pour comprendre le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺, nous avons analysé leur développement, leur fonction cytokinique ainsi que leur fonction protectrice dans deux

modèles de colites. Malgré une forte expression de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ ⁺, nous n'avons pas mis en évidence de différences entre les animaux contrôles et les animaux DKO. De plus, nous n'avons pas reproduit les résultats que nous avons obtenus dans le modèle de DSS avec les souris DKO générées en fond génétique mélangé. L'une des hypothèses, pour expliquer l'absence de phénotype dans les souris DKO pures, pourrait être que l'exacerbation des symptômes que nous avons observés était due aux gènes situés à proximité du locus de *Tmem176a* et *b* et provenant du fond génétique DBA/2, comme il a été récemment décrit (Chilsom *et al.*, 2019; Dikiy et Rudensky, 2019). Une autre hypothèse est que le fond génétique influence le microbiote. Il est possible que le fond DBA/2 soit plus susceptible aux modèles de colite et qu'il induise un phénotype plus fort. Ces résultats renforcent la nécessité de travailler sur des souris issues d'un fond génétique pur comme nous l'avons fait.

Dans ces souris DKO pures, nous avons majoritairement étudié le rôle des gènes homologues en condition de danger (colites *in vivo*) ou après une stimulation cytokinique (*in vitro*). C'est pourquoi, étudier leur rôle dans des conditions normales représenterait une perspective d'étude intéressante. Une étude histologique de l'intestin et du colon pourrait être réalisée afin de vérifier la structure du tissu et de mettre en évidence la répartition cellulaire des cellules ROR γ ⁺ par des marqueurs fluorescents. Les LTi sont les cellules à l'origine de la formation des ganglions, des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes isolés dans la lamina propria. Au cours des prélèvements des organes et des analyses en FACS, nous n'avons pas observé de différences entre les animaux contrôles et DKO. Néanmoins, il serait intéressant de vérifier si les souris déficientes présentent des ganglions normaux avec une répartition des zones B et T non altérée et une organisation cellulaire normale dans la lamina propria intestinale. Nous avons commencé une étude anatomopathologique en collaboration avec la plateforme APEX d'anatomopathologie (ONIRIS, Nantes). Nous avons analysé deux animaux contrôles et deux animaux DKO. Plusieurs organes ont été prélevés, notamment, la rate, les ganglions mésentériques, une section de l'iléum et une du colon. Une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine n'a pas mis en évidence de différences structurales dans ces organes. Néanmoins, il s'agissait d'un petit nombre d'animaux. Il serait intéressant de poursuivre cette étude et de la compléter avec des marquages spécifiques des différents types cellulaires. Dans les ganglions, un marquage des lymphocytes T avec un anti-CD4 et un anti-CD8 associé à un marqueur des cellules B, tel que le CD19, mettrait en

évidence leur répartition. Dans la lamina propria, il serait intéressant de regarder les cellules ROR γ t⁺, en co-marquage avec un anti-CD3 pour identifier les Th17 alors qu'un marquage ROR γ t⁺CD3⁻ serait associé aux ILC3. De plus, un marquage de cellules B et T pourrait mettre en évidence les ILFs qui sont des organes lymphoïdes disséminés dans la lamina propria.

Les cellules ROR γ t⁺, notamment les ILC3, ont des fonctions fortement associées au microbiote. Une altération de ces cellules pourrait provoquer une dysbiose, c'est-à-dire un déséquilibre du microbiote intestinal. Dans cet objectif d'étudier le rôle de TMEM176A et B dans des conditions normales, il serait intéressant d'analyser le microbiote des souris contrôles et DKO, en particulier le nombre et la diversité des souches bactériennes (collaboration avec Emmanuel Montassier CHU de Nantes).

En condition d'inflammation ou d'infection, les modèles de colite nous ont permis d'investiguer le rôle protecteur des cellules ROR γ t dans la réparation tissulaire et dans la résistance à l'infection. Néanmoins, nous n'avons pas testé de modèles impliquant la pathogénicité de ces cellules. Comme je l'ai présenté dans l'introduction, ce rôle pathogénique a clairement été décrit dans le psoriasis chez l'homme et chez la souris. Une perspective d'étude, pour comprendre le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR γ t, pourrait être l'analyse du modèle psoriasis.

Dans une étude de l'équipe de Grégory Sonnenberg en 2013, il a été mis en évidence que les cellules ILC3 étaient importantes pour la régulation de la réponse anti-commensale, et cela indépendamment de la sécrétion des cytokines IL-17A, IL-17F et IL-22 (Hepworth *et al.*, 2013). Ces cellules expriment le CMH de classe II et limitent la réponse des lymphocytes T CD4⁺ contre les bactéries commensales. De manière similaire à cette étude, nous avons mesuré si la réponse adaptative anti-commensale était non contrôlée dans les souris DKO. Nous avons quantifié les cellules T CD4⁺CD44^{hi}CD62^{low} dans la lamina propria intestinale, la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et le recrutement des neutrophiles sans observer de différences entre les animaux wild-type et DKO. Néanmoins, il serait intéressant de mesurer l'expression de *Tmem176a* et *b* dans cette sous-population exprimant le CMH de classe II, une molécule commune aux DCs. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence une augmentation des IgG anti-commensales dans le sérum. Il pourrait être intéressant de mesurer ces IgG dans le sérum de nos souris DKO. Récemment, ce groupe a également mis en évidence que la principale source d'IL-2 nécessaire à l'induction des Treg dans l'intestin est les ILC3 (Zhou *et al.*, 2019). Chez les animaux DKO, nous n'avons pas observé de

différence en terme de nombre et de fréquence des Treg. Néanmoins, il serait intéressant de mesurer la capacité des ILC3 déficientes pour *Tmem176a* et *b* à produire l'IL-2.

De manière intéressante, l'expression du gène *Aire* par une population d'ILC3 dans les ganglions a été mise en évidence récemment (Yamano *et al.*, 2019). Une description morphologique et un profil d'expression de cette sous-population ont été réalisés; néanmoins, la fonction de ces cellules n'a pas encore été décrite. Ainsi, l'identification de nouvelles fonctions associées à l'immunité de type 17 pourrait mettre en évidence l'implication de *Tmem176a* et *b* dans cellules ROR γ ⁺.

Malgré l'absence de différences dans les modèles que nous avons utilisés, il est possible que *Tmem176a* et *b* aient un rôle majeur dans les ILC3. Ainsi, leur absence pourrait être compensée par d'autres canaux ioniques. Il serait très intéressant de réaliser une analyse RNA seq sur ces cellules. Elle pourrait mettre en évidence les gènes qui sont dérégulés en absence de *Tmem176a* et *b* et, également, montrer si des gènes sont plus fortement exprimés pour compenser leur absence.

Ainsi, la question du rôle de *Tmem176a* et *b* reste complètement ouverte dans les cellules ROR γ ⁺. Il est possible que leur fonction soit importante et, de ce fait, qu'elle soit compensée en leur absence. La cellule a une forte capacité d'adaptation et seulement un petit nombre de gènes est capable d'induire un phénotype fort en son absence (par exemple, *Foxp3* ou *Aire*). Les cellules ROR γ ⁺ ont été identifiées et caractérisées il y a environ une dizaine d'années. Notre compréhension en est encore incomplète. L'identification de nouvelles fonctions pourrait mettre en évidence un lien avec *Tmem176a* et *b*.

Quel est le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les DCs ?

En parallèle de cette première partie focalisée sur les cellules ROR γ ⁺, nous nous sommes intéressés au rôle de *Tmem176a* et *b* dans les DCs, dans lesquelles ces gènes ont été initialement identifiés. De manière similaire aux cellules ROR γ ⁺, nous avons mis en évidence que le développement et la capacité des DCs à maturer ne sont pas altérés en l'absence des homologues. Par contre, l'analyse épigénétique des DCs a mis en évidence une dérégulation des molécules associées à la voie de présentation du CMH de classe II en absence des gènes. De manière intéressante, en comparaison avec des modèles *in vivo* impliquant les lymphocytes T CD8⁺, seuls les modèles impliquant les lymphocytes T CD4⁺ ont mis en évidence des symptômes diminués chez les animaux DKO. Nous sommes allés plus loin dans

l'étude de ces modèles T CD4⁺ en utilisant, soit la protéine entière, soit un peptide, pour l'immunisation des animaux (EAE et DTH). Nous avons mis en évidence que le défaut de prolifération des T CD4⁺ n'est observé qu'avec la protéine, c'est-à-dire quand la DC a besoin d'apprêter l'antigène exogène. Ainsi, l'absence de *Tmem176a* et *b* n'altère pas les fonctions intrinsèques aux cellules T, ni l'expression des molécules du CMH II et de co-stimulation à la surface des DCs. Par contre, l'absence de ces gènes réduit significativement, mais pas totalement, la présentation des antigènes par la voie du CMH de classe II pour l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Nous avons essayé de comprendre comment cette voie pouvait être impactée. Nous n'avons pas observé de différences en terme d'endocytose ni de dégradation des antigènes; par contre, nous avons mis en évidence une augmentation de la molécule H2-M (orthologue de HLA-DM chez l'homme) induisant le chargement des peptides exogènes sur la molécule du CMH de classe II. Ces résultats à priori contre-intuitifs pourraient s'expliquer par un défaut fonctionnel de la protéine HLA-DM ou un problème de localisation qui serait compensé par l'augmentation de la quantité de la protéine produite.

Comment expliquer la surexpression de la molécule HLA-DM ?

Le fait que la cellule ait besoin de produire plus de molécules HLA-DM pourrait signifier que la molécule ne fonctionne pas de manière efficace pour catalyser le changement du peptide CLIP par un peptide exogène. Dans ce cas, nous devrions observer plus de complexes CMH-peptide CLIP à la surface, comme il est observé chez les souris déficientes pour HLA-DM (Fung-Leung *et al.*, 1996). Il est possible de quantifier ce complexe en cytométrie en utilisant un anticorps (anti-MHC II clone 15G4) (van Niel *et al.*, 2006).

Il est également possible qu'en absence de *Tmem176a* et *b*, le transport de la molécule HLA-DM soit altéré. L'augmentation de la protéine HLA-DM pourrait alors être expliquée par une mauvaise localisation intracellulaire, notamment une accumulation anormale hors du compartiment MIIC. Pour étudier cette question, il faudrait réaliser un marquage anti-HLA-DM sur des DCs triées ou sur des BMDCs. Si le marquage en immunofluorescence n'est pas affecté, il est possible que la localisation de la molécule au sein du compartiment MIIC soit altérée. En effet, il a été mis en évidence que le clivage du peptide CLIP et le chargement du peptide exogène, catalysé par HLA-DM, se déroule à l'intérieur de vésicules (ILVs) et non pas à la membrane externe du compartiment (Zwart *et al.*, 2005). Pour atteindre ces sites internes, les molécules doivent être ubiquitinées. Elles sont ensuite transportées grâce au

système ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Raiborg et Stenmark, 2009). Il est possible que l'ubiquitination ou le système ESCRT ne fonctionne pas de manière optimale. Il serait intéressant de regarder en microscopie électronique si les DCs déficientes pour *Tmem176a* et *b* possèdent, dans le compartiment MIIC, des invaginations plasmiques correspondant aux ILVs. Une mauvaise localisation de la molécule HLA-DM aura pour conséquence une diminution de l'interaction HLA-DM/HLA-DR. Un microscope confocal de haute résolution pourrait permettre de mettre en évidence la proximité entre les molécules HLA-DR et HLA-DM, suggérant une interaction entre elles. Il est également possible de mesurer cette interaction par la technique du FRET en transfectant les molécules HLA-DM/CFP et HLA-DR/YFP (Zwart *et al.*, 2005). Le FRET consiste en un transfert d'énergie entre deux fluorochromes. Dans ce cas, l'émission de la protéine CFP est diminuée et celle de la YFP augmentée. Ce transfert d'énergie dépend de la distance entre les molécules. Pour qu'il fonctionne, les molécules doivent être suffisamment proches (de 49 à 51 Angström). Ainsi, si le processus de FRET est observable entre les molécules, cela signifie très probablement que les molécules interagissent (Zwart *et al.*, 2005). Ce système est délicat puisqu'il est nécessaire de faire entrer les molécules HLA-DM/CFP et HLA-DR/YFP dans les DCs. Ces cellules ne se transfectant pas facilement, il faudrait un système d'infection ou l'utilisation de BMDCs.

Une alternative pour observer la localisation de HLA-DM et son interaction avec HLA-DR pourrait être de générer une lignée cellulaire DKO pour *Tmem176a* et *b*. Pour cela, il est possible d'utiliser la technique des Crispr-Cas9 sur les cellules Hela CIITA. La technique du RUSH sur ces cellules DKO pourrait mettre en évidence un problème de localisation de HLA-DM et une diminution de l'interaction HLA-DM/HLA-DR.

TMEM176A et B ont-ils un rôle direct dans le compartiment MIIC ?

Nous nous sommes également intéressés à la localisation intracellulaire de TMEM176A et B dans l'objectif qu'elle puisse apporter des informations supplémentaires sur leur fonction. Deux études, dont une réalisée par notre équipe, ont mis en évidence une localisation préférentielle des homologues dans les phagosomes (Shui *et al.*, 2008; Segovia *et al.*, 2014). A l'inverse, une analyse récente a montré une co-localisation de TMEM176A et B avec le *trans*-Golgi network (Drujont *et al.*, 2016). Dans le but d'analyser finement et de comprendre ces résultats contradictoires, nous avons utilisé une méthode d'imagerie en temps réel

permettant de suivre avec précision le trajet des protéines d'intérêt, du réticulum endoplasmique où elles sont retenues jusqu'à leur compartiment de localisation (le RUSH) (Boncompain *et al.*, 2012). Cette technique présente deux grands avantages. Il s'agit d'une analyse dynamique sur cellules vivantes dans des conditions physiologiques (37°C et 5% de CO₂). Ensuite, elle n'utilise pas d'anticorps, ce qui permet de nous affranchir d'une limite technique très dépendante de la qualité de l'anticorps. A l'inverse, la protéine d'intérêt étant fusionnée à deux tags (la SBP et l'EGFP), il est possible que sa localisation soit affectée par leur présence. Néanmoins, toutes les molécules testées par l'équipe de Franck Perez, tels que la Golgin-84 et le CD44 utilisés dans cette étude, sont adressées dans le bon compartiment, respectivement l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Boncompain *et al.*, 2012; Fourriere *et al.*, 2019; Moti *et al.*, 2019). Grâce à cette technique, nous avons montré que TMEM176A et B sont co-localisées. De façon très intéressante, ces protéines ne sont pas statiques mais, au contraire, localisées dans des vésicules dynamiques. En utilisant des molécules et des sondes dont nous connaissons la localisation, nous avons mis en évidence que TMEM176A et B sont préférentiellement associées à des vésicules de la voie endo-lysosomale. En regroupant ces résultats avec la diminution de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ liée à l'apprêtement des antigènes exogènes, nous nous sommes demandés si TMEM176A et B pouvaient avoir un rôle dans le compartiment du CMH de classe II, le MIIC. De manière intéressante, nous avons mis en évidence que ces protéines sont co-localisées avec HLA-DM. Ainsi ces canaux ioniques pourraient interagir directement dans le compartiment du CMH de classe II (MIIC).

Par quels mécanismes *Tmem176a* et *b* participeraient-ils à la présentation par la voie du CMH de classe II ?

Dans le compartiment MIIC, les processus d'apprêtement des antigènes sont finement régulés par le pH. Il a été montré que l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM est sensible au pH. De la même manière, HLA-DO et HLA-DM interagissent de manière pH dépendante. TMEM176A et B étant des canaux ioniques, ils pourraient participer à la régulation du pH dans le compartiment MIIC. La sortie de cations (Na⁺) médiée par TMEM176A et B pourrait permettre la rentrée de protons H⁺ et l'acidification du compartiment. Ainsi les homologues auraient un rôle de courant contre-ionique (Casey, Grinstein et Orłowski, 2010). En l'absence

de *Tmem176a* et *b*, le pH pourrait être altéré, ce qui pourrait expliquer un moins bon chargement du peptide (**Figure 25**).

Ainsi, il serait très intéressant de mesurer le pH dans ce compartiment. Il est possible de mesurer le pH des endosomes et des phagosomes en utilisant des molécules fluorescentes sensibles au pH (FITC et Alexa-647). Ces molécules peuvent être couplées ou non à des molécules plus grosses, tels que le dextran et le zymosan, pour être spécifiquement endocytées ou phagocytées. En étant internalisées, ces molécules permettent de mesurer le pH spécifiquement dans les organites. Le pH est déterminé grâce à une gamme de calibration (Maschalidi *et al.*, 2017). Récemment, l'équipe de Jinming Gao, a mis au point des nanosondes nommées UPS (ultra-pH-sensitive) qui permettent de suivre le pH au cours de la maturation des endosomes jusqu'aux lysosomes (Yiguang Wang *et al.*, 2017). Ces nanoparticules sont liées à différents fluorochromes selon leur fenêtre de sensibilité au pH. Au cours de l'endocytose, les nanoparticules vont devenir fluorescentes chacune à leur tour en fonction du pH et ce changement de fluorescence est observable en microscopie. Cette nouvelle technologie pourrait être très intéressante pour l'étude de TMEM176A et B, afin de mettre en évidence si le pH est correctement contrôlé dans la voie endo-lysosomale.

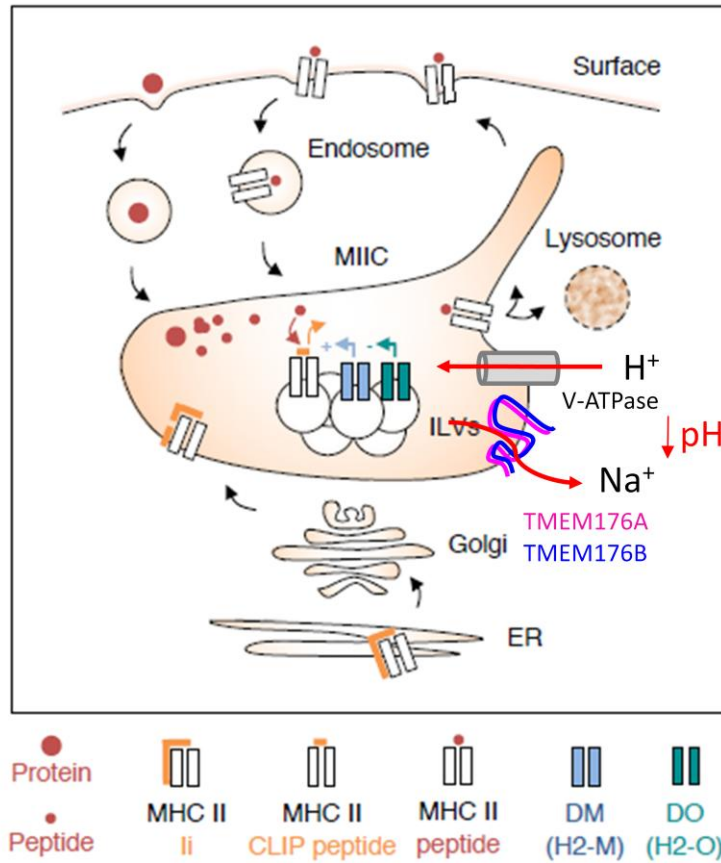


Figure 25 Dans le compartiment CIITA, le pH est finement régulé pour les mécanismes d'apprêtement des antigènes. TMEM176A et B pourraient participer à cette régulation. En induisant la sortie d'ion Na^+ , ils permettraient l'entrée de H^+ par la v-ATPase pour l'acidification du compartiment. Ainsi, TMEM176A/B auraient un rôle de courant contre-ionique.

Il a également été mis en évidence que les cathepsines, nécessaires à la dégradation optimale des antigènes pour leur chargement dans le sillon de la molécule du CMH de classe II, sont sensibles au pH. Ces protéases fonctionnent à pH acide. Nous avons mesuré l'expression de ces cathepsines en qPCR et n'avons pas observé de différence entre les DCs contrôles et DKO (résultats non montrés). Néanmoins, ces résultats n'excluent pas un problème en aval de l'ARNm. Ainsi, il serait intéressant d'explorer leur capacité protéolytique. Pour cela, il est possible de mesurer la fluorescence obtenue après la dégradation de substrats spécifiques des cathepsines (Maschalidi *et al.*, 2017). Les cellules sont incubées avec ces substrats, par exemple, Z-Phe-Arg-NHMec pour les cathepsines B et L et Z-Val-Val-Arg-NHMec pour les cathepsines S. Lorsque ces substrats sont clivés par les cathepsines, une fluorescence est émise.

Il est également possible que la fonction de TMEM176A et B soit indépendante de leur fonction ionique et soit liée à une interaction avec d'autres protéines. Il a été mis en

évidence que les homologues peuvent se lier entre eux (Condamine *et al.*, 2010) et avec d'autres protéines. En effet, il a été suggéré que les homologues pourraient interagir avec la protéine TRPML2 (transient receptor potential channel mucolipin 2) qui est également un canal ionique localisé dans les endosomes (abstract de thèse Podevin *et al.*, 2013). Dans le compartiment MIIC, des interactions entre protéines ont été montrées, notamment entre les protéines CD63 et CD82, qui sont des tétraspanines, et les molécules HLA-DM et HLA-DR (Hammond *et al.*, 1998; Engering et Pieters, 2001). Il a été mis en évidence que les tétraspanines stabilisent le complexe CMH II-DM (van den Hoorn, *et al.* 2012). De manière intéressante, les tétraspanines sont des protéines à quatre domaines transmembranaires, comme TMEM176A et B. Bien que les deux gènes n'aient pas été rattachés à la famille des tétraspanines, il est possible que TMEM176A et B puissent avoir un rôle similaire en interagissant avec HLA-DR, HLA-DM ou HLA-DO (**Figure 26**). Pour mettre en évidence une potentielle interaction entre TMEM176A et B et les molécules de la voie du CMH de classe II, il serait intéressant de réaliser une immuno-précipitation à partir de lysats de DCs contrôles et DKO. Par exemple, un anticorps anti-H2-M (chez la souris) serait utilisé pour isoler les complexes protéiques contenant la molécule. Puis en Western Blot, en utilisant un anticorps anti-TMEM176A ou B, il serait possible de révéler les complexes formés de H2-M et de TMEM176A ou B.

De manière intéressante, il a été mis en évidence que les molécules du CMH de classe II sont associées à des microdomaines riches en cholestérol (lipid raft) pour leur transport. En effet, il a été montré que le complexe CMH II-li est lié à ces microdomaines lors de leur transport à travers l'appareil de Golgi et jusqu'au compartiment MIIC (Anderson et Roche, 2015). De plus, environ 60% des molécules du CMH de classe II nouvellement synthétisées restent associées aux microdomaines lipidiques au cours du chargement du peptide exogène et du transport du complexe CMH-peptide à la surface cellulaire. Une étude a mis en évidence une association génétique entre TMEM176A et le taux de cholestérol HDL chez l'homme (Global Lipids Genetics Consortium, 2013). Ainsi TMEM176A et B pourraient avoir une fonction en lien avec l'association du CMH de classe II et des microdomaines lipidiques.

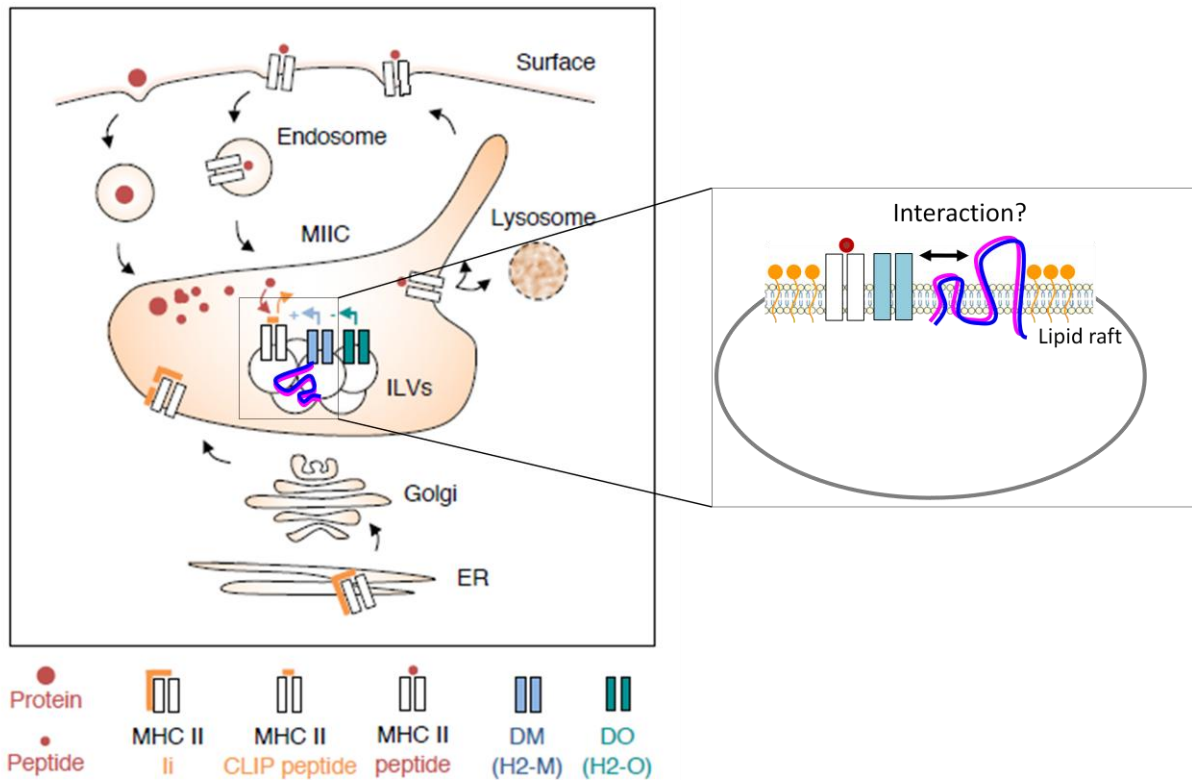


Figure 26 TMEM176A/B pourraient interagir avec les molécules de la voie du CMH de classe II telle que HLA-DM indépendamment de leur fonction de canal ionique. Cette interaction pourrait être liée aux microdomaines lipidiques (lipid raft) impliqués dans le transport de la molécule HLA-DM.

Impact sur la dynamique des molécules de CMH de classe II ?

Une autre hypothèse serait que la dynamique du CMH de classe II soit altérée. En effet, il est possible que la stabilité du complexe CMH II-peptide soit diminuée et que le complexe ne soit pas transporté correctement à la membrane. Il est également possible que ce complexe ne soit pas correctement endocyté depuis la surface membranaire. Dans ce cas, les complexes CMH II-peptide pourraient ne pas être exposés à la surface suffisamment longtemps. Une technique intéressante pour étudier la dynamique du CMH de classe II est l'Amnis (Hennies, Lehn et Janssen, 2015). Il s'agit d'une technique combinant cytométrie en flux et imagerie et permettant l'analyse de l'endocytose et du transport intracellulaire de la molécule du CMH de classe II dans des cDCs.

L'expression de *Tmem176a* et *b* peut-elle être induite par le CIITA ?

L'expression des molécules de la voie du CMH de classe II est finement régulée par le co-activateur CIITA, dans les DCs et également dans les ILC3. Il serait très intéressant de déterminer si l'expression de *Tmem176a* et *b* peut être contrôlée par cette protéine. Pour

cela, l'expression des gènes pourrait être mesurée par qPCR dans des cellules HeLa CIITA exprimant le co-activateur. Pour cette analyse, il faudrait avoir en contrôle les mêmes cellules HeLa n'exprimant pas le CIITA. Par exemple, il serait possible d'inhiber l'expression du co-activateur par des siRNA.

Une alternative serait de mesurer l'expression de *Tmem176a* et *b* dans les DCs de souris déficientes pour le CIITA en comparaison à des souris contrôles (Hepworth *et al.*, 2015). De plus, la transcription du co-activateur est induite par différents promoteurs (pI, pIII, pIV) dépendants de signaux différents. Des souris, déficientes seulement pour l'un des promoteurs, ont été générées (Hepworth *et al.*, 2015). L'identification du promoteur, qui pourrait induire l'expression des homologues, pourrait donner des indications sur les signaux déclenchant leur transcription. La régulation de l'expression des homologues par le CTIIA confirmerait son rôle majeur dans la voie du CMH de classe II.

Analyse RNAseq des cellules dendritiques DKO

De manière similaire à l'étude épigénétique que nous avons réalisée, il serait intéressant de faire une étude de RNA seq sur les DCs DKO en comparaison aux cellules contrôles. Cette étude permettrait de confirmer la dérégulation des molécules de la voie du CMH de classe II et pourrait mettre en évidence la dérégulation d'autres molécules. Les phénotypes que nous avons observé pour les modèles d'EAE, de DTH et la prolifération *in vivo* étaient partiels. C'est pourquoi, il est possible que TMEM176A et B soient compensés par d'autres canaux ioniques. L'analyse RNAseq pourrait mettre en évidence la surexpression d'autres molécules.

***Tmem176a* et *b* ont-ils un rôle dans les autres sous-populations de DCs ?**

Dans cette étude, je me suis focalisée sur les DCs résidentes des organes lymphoïdes. Au sein de ces cellules, nous avons mis en évidence une surexpression de *Tmem176a* et *b* dans les cDC2 en comparaison aux cDC1 et aux pDC. Cependant, il serait intéressant de mesurer leur expression dans d'autres sous-populations, notamment les DCs tissulaires. En effet, une étude a montré une forte expression des homologues dans les DCs interstitielles des poumons et du foie (Croizat *et al.*, 2011).

Deux études récentes ont mis en évidence le rôle majeur des cDC2 dans l'induction de réponses immunitaires spécifiques. En effet, l'équipe d'Elodie Segura a mis en évidence que les cDC2 des amygdales (et les macrophages CD14⁺) sont les meilleures cellules pour induire

la réponse Tfh (Durand *et al.*, 2019). Une autre étude, réalisée par l'équipe de Matthew Krummel, a mis en évidence le rôle majeur des cDC2 migratoires dans la réponse anti-tumorale en absence des Treg (Binnewies *et al.*, 2019). De manière intéressante, les auteurs ont montré une expression forte de *Tmem176a* et *b* dans les cDC2 migratoires dans le ganglion drainant à proximité de la tumeur. Dans des conditions normales, les cDC2 sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ dans le ganglion drainant mais n'induisent pas une réponse anti-tumorale efficace. De manière intéressante, chez des souris déficientes pour *Foxp3* (*Foxp3*^{DTR}) chez lesquelles les Treg sont absentes, les cDC2 induisent une forte réponse anti-tumorale. Il pourrait être intéressant de mesurer la réponse anti-tumorale chez des souris DKO en absence des Treg. Pour cela, il faudrait croiser les souris DKO avec des souris *Foxp3*^{DTR}. De cette manière, nous pourrions observer l'impact de l'absence de *Tmem176a* et *b* sur la réponse anti-tumorale.

Ainsi, le rôle spécifique des cDC2 dans la réponse immunitaire commence à émerger et pourrait impliquer *Tmem176a* et *b*.

Rôle dans la tolérance des antigènes ?

Dans cette étude, nous n'avons pas investigué la capacité tolérogénique des DCs dont j'ai brièvement décrit l'importance dans l'introduction. Il serait très intéressant de tester un modèle de tolérance orale afin de mettre en évidence un potentiel défaut de tolérance aux antigènes alimentaires (Giovangiulio *et al.*, 2016). Dans ce modèle, les souris sont gavées trois fois avec de l'OVA (jour 0, 3 et 6) puis un modèle de DTH classique est réalisé. Les souris reçoivent une immunisation OVA-CFA au jour 14. Puis, sept jours après, le challenge est réalisé en injectant de l'OVA seul. Les animaux ayant mis en place une tolérance à l'OVA ne présentent pas d'épaississement de la patte. L'utilisation des souris conditionnelles CD11cCre permettrait d'attribuer le phénotype observé au rôle de *Tmem176a* et *b* dans les DCs pour l'établissement de la tolérance.

Conclusion

Contrairement aux cellules RORγt⁺ dans lesquelles *Tmem176a* et *b* ne semblent pas avoir un rôle essentiel, j'ai mis en évidence que *Tmem176a* et *b* sont impliqués dans la présentation des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD4⁺. En effet, la prolifération des cellules T CD4⁺ est diminuée de façon partielle dans les souris déficientes pour *Tmem176a* et *b*. De plus,

l'analyse de la localisation intracellulaire des protéines homologues a mis en évidence que celles-ci pourraient agir directement dans le compartiment MIIC d'apprêtement des antigènes. Pour mieux comprendre le rôle de *Tmem176a* et *b* dans les DCs, ce travail a permis de focaliser les perspectives d'étude directement dans le compartiment MIIC.

Bibliographie

- Adachi, O. *et al.* (1998) 'Targeted Disruption of the MyD88 Gene Results in Loss of IL-1- and IL-18-Mediated Function', *Immunity*, 9(1), pp. 143–150. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80596-8.
- Aggarwal, S. *et al.* (2003) 'Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17', *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), pp. 1910–1914. doi: 10.1074/jbc.M207577200.
- Akira, S. (2003) 'Mammalian Toll-like receptors', *Current Opinion in Immunology*, 15(2), p. 238. doi: 10.1016/S0952-7915(03)00005-0.
- Allan, R. S. *et al.* (2006) 'Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming', *Immunity*, 25(1), pp. 153–162. doi: 10.1016/j.immuni.2006.04.017.
- Alloatti, A. *et al.* (2017) 'Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(8), pp. 2231–2241. doi: 10.1084/jem.20170229.
- Anderson, H. A. and Roche, P. A. (2015) 'MHC class II association with lipid rafts on the antigen presenting cell surface', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(4), pp. 775–780. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.09.019.
- Ardain, A. *et al.* (2019) 'Group 3 innate lymphoid cells mediate early protective immunity against tuberculosis', *Nature*, 570(7762), pp. 528–532. doi: 10.1038/s41586-019-1276-2.
- Arora, S., Lapinski, P. E. and Raghavan, M. (2001) 'Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), pp. 7241–7246. doi: 10.1073/pnas.131132198.
- Baas, M.C. *et al.* (2014) 'Combining Autologous Dendritic Cell Therapy with CD3 Antibodies Promotes Regulatory T Cells and Permanent Islet Allograft Acceptance' *Journal of Immunology*, doi: 10.4049/jimmunol.1401423
- Baeten, D. *et al.* (2015) 'Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis', *New England Journal of Medicine*, 373(26), pp. 2534–2548. doi: 10.1056/NEJMoa1505066.
- Baravalle, G. *et al.* (2011) 'Ubiquitination of CD86 Is a Key Mechanism in Regulating Antigen Presentation by Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 187(6), pp. 2966–2973. doi: 10.4049/jimmunol.1101643.
- Basha, G. *et al.* (2012) 'A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway', *Nature Immunology*, doi: 10.1038/ni.2225.
- Becke-André, M. André, E. and DeLamater, J.F. (1993) 'Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 10.1006/bbrc.1993.1976.
- Becker, A. M. *et al.* (2012) 'IRF-8 extinguishes neutrophil production and promotes dendritic cell lineage commitment in both myeloid and lymphoid mouse progenitors', *Blood*, 119(9), pp. 2003–2012. doi: 10.1182/blood-2011-06-364976.
- Benaroch, P. and Yilla, M. (1995) 'How MHC class II molecules reach the endocytic pathway', p. 13.
- Beriou, G. *et al.* (2005) 'Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression' *Transplantation*, doi: 10.1097/01.tp.0000158277.50073.35.
- Bettelli, E. *et al.* (2004) 'Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Experimental Medicine*, 200(1), pp. 79–87. doi: 10.1084/jem.20031819.

- Bevan, M.J. (1976) 'Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay', *Journal of Immunology*.
- Binnewies, M. *et al.* (2019) 'Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity', *Cell*, 177(3), pp. 556-571.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.005.
- Birling, M.-C. *et al.* (2012) 'Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background', *genesis*, 50(6), pp. 482–489. doi: 10.1002/dvg.20826.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A. and Cresswell, P. (2013) 'Pathways of Antigen Processing', *Annual Review of Immunology*, 31(1), pp. 443–473. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910.
- Blum, K. S. and Pabst, R. (2006) 'Keystones in lymph node development: Lymph node development, K. S. Blum and R. Pabst', *Journal of Anatomy*, 209(5), pp. 585–595. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00650.x.
- Boehm, U. *et al.* (1997) 'CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- γ ', *Annual Review of Immunology*, 15(1), pp. 749–795. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.749.
- Boes, M. *et al.* (2002) 'T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport', *Nature*, 418(6901), pp. 983–988. doi: 10.1038/nature01004.
- Boncompain, G. *et al.* (2012) 'Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells', *Nature Methods*, 9(5), pp. 493–498. doi: 10.1038/nmeth.1928.
- Bonifaz, L. C. *et al.* (2004) 'In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination', *The Journal of Experimental Medicine*, 199(6), pp. 815–824. doi: 10.1084/jem.20032220.
- Bonneville, M., O'Brien, R. L. and Born, W. K. (2010) ' $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity', *Nature Reviews Immunology*, 10(7), pp. 467–478. doi: 10.1038/nri2781.
- Bremnes, B. *et al.* (1994) 'An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization', p. 12.
- Brockner, T., Riedinger, M. and Karjalainen, K. (1997) 'Targeted Expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II Molecules Demonstrates that Dendritic Cells Can Induce Negative but Not Positive Selection of Thymocytes In Vivo', *The Journal of Experimental Medicine*, 185(3), pp. 541–550. doi: 10.1084/jem.185.3.541.
- ten Broeke, T., Wubbolts, R. and Stoorvogel, W. (2013) 'MHC Class II Antigen Presentation by Dendritic Cells Regulated through Endosomal Sorting', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(12), pp. a016873–a016873. doi: 10.1101/cshperspect.a016873.
- Busch, R., Cloutier, I. and Sekaly, R.-P. (1996) 'Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum', p. 11
- Cai, Y. *et al.* (2011) 'Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation.pdf' *Immunity*, doi: 10.1016/j.immuni.2011.08.001.
- Carlberg, C. *et al.* (1994) 'RZR α , a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers', *Molecular Endocrinology*, 10.1210/mend.8.6.7935491.
- Carotta, S., Wu, L. and Nutt, S. L. (2010) 'Surprising new roles for PU.1 in the adaptive immune response: PU.1 function in lymphocytes', *Immunological Reviews*, 238(1), pp. 63–75. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00955.x.
- Casey, J. R., Grinstein, S. and Orlowski, J. (2010) 'Sensors and regulators of intracellular pH', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(1), pp. 50–61. doi: 10.1038/nrm2820.

- Caton, M. L., Smith-Raska, M. R. and Reizis, B. (2007) 'Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁻ dendritic cells in the spleen', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(7), pp. 1653–1664. doi: 10.1084/jem.20062648.
- Cebrian, I. *et al.* (2011) 'Sec22b Regulates Phagosomal Maturation and Antigen Crosspresentation by Dendritic Cells', *Cell*, 147(6), pp. 1355–1368. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.021.
- Cella, M. *et al.* (2009) 'A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity', *Nature*, 457(7230), pp. 722–725. doi: 10.1038/nature07537.
- Chang, S.-C. *et al.* (2005) 'The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), pp. 17107–17112. doi: 10.1073/pnas.0500721102.
- Chassaing, B. *et al.* (2014) 'Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice: DSS-Induced Colitis in Mice', in Coligan, J. E. *et al.* (eds) *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 15.25.1-15.25.14. doi: 10.1002/0471142735.im1525s104.
- Chen, Y. *et al.* (2017) 'Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers', *The Journal of Cell Biology*, 216(12), pp. 4141–4151. doi: 10.1083/jcb.201707172.
- Chisolm, D. A. *et al.* (2019) 'Defining Genetic Variation in Widely Used Congenic and Backcrossed Mouse Models Reveals Varied Regulation of Genes Important for Immune Responses', *Immunity*, 51(1), pp. 155-168.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.006.
- Ciofani, M. *et al.* (2012) 'A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification', *Cell*, 151(2), pp. 289–303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016.
- Coffman, R. *et al.* (1989) 'Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice', *Science*, 245(4915), pp. 308–310. doi: 10.1126/science.2787531.
- Collins, J. W. *et al.* (2014) 'Citrobacter rodentium: infection, inflammation and the microbiota', *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), pp. 612–623. doi: 10.1038/nrmicro3315.
- Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y.-J. (2004) 'Plasmacytoid dendritic cells in immunity', *Nature Immunology*, 5(12), pp. 1219–1226. doi: 10.1038/ni1141.
- Condamine, T. *et al.* (2010) 'Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 88(3), pp. 507–515. doi: 10.1189/jlb.1109738.
- Cox, J. H. *et al.* (2012) 'Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice', *Mucosal Immunology*, 5(1), pp. 99–109. doi: 10.1038/mi.2011.54.
- Crinier, A. *et al.* (2017) 'Les cellules lymphoïdes innées', *médecine/sciences*, 33(5), pp. 534–542. doi: 10.1051/medsci/20173305018.
- Crotzer, V. L. and Blum, J. S. (2010) 'Autophagy and adaptive immunity: Autophagy and immunity', *Immunology*, p. no-no. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03321.x.
- Crozat, K. *et al.* (2011) 'Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8α⁺ Type', *The Journal of Immunology*, 187(9), pp. 4411–4415. doi: 10.4049/jimmunol.1101717.
- Cruz, F. M. *et al.* (2017) 'The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules', *Annual Review of Immunology*, 35(1), pp. 149–176. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055254.

- Cruz, M.S. *et al.* (2018) 'Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cells in Skin Immunity and Disease', *Frontiers in Immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2018.01304.
- Cua, D. J. *et al.* (2003) 'Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain', *Nature*, 421(6924), pp. 744–748. doi: 10.1038/nature01355.
- Cuajungco, M. P. *et al.* (2012) 'Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology', *Acta Histochemica*, 114(7), pp. 705–712. doi: 10.1016/j.acthis.2011.12.006.
- Dausset J. (1958) 'Iso-leuco-anticorps', *Acta Haematologica*. p. 1. doi: 20:156-66, 1958.
- De Togni, P. *et al.* (1994) 'Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin', *Science*, 264(5159), pp. 703–707. doi: 10.1126/science.8171322.
- Delamarre, L. *et al.* (2005) 'Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate', *Science*, 307(5715), pp. 1630–1634. doi: 10.1126/science.1108003.
- Denzin, L. K. *et al.* (1994) 'Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells', *Immunity*, 1(7), pp. 595–606. doi: 10.1016/1074-7613(94)90049-3.
- Denzin, L. K. and Cresswell, P. (1995) 'HLA-DM Induces CLIP Dissociation from MHC Class II ap Dimers and Facilitates Peptide Loading', p. 11.
- Devi, K. S. P. and Anandasabapathy, N. (2017) 'The origin of DCs and capacity for immunologic tolerance in central and peripheral tissues', *Seminars in Immunopathology*, 39(2), pp. 137–152. doi: 10.1007/s00281-016-0602-0.
- Di, L. *et al.* (2010) 'Inhibition of the K⁺ channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), pp. 1541–1546. doi: 10.1073/pnas.0910133107.
- Dieu, M.-C. *et al.* (1998) 'Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites', *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), pp. 373–386. doi: 10.1084/jem.188.2.373.
- Dieu-Nosjean, M.-C. *et al.* (2000) 'Macrophage Inflammatory Protein 3_L Is Expressed at Inflamed Epithelial Surfaces and Is the Most Potent Chemokine Known in Attracting Langerhans Cell Precursors', p. 13.
- Dikiy, S. and Rudensky, A. Y. (2019) 'Mouse Watch: A Cautionary Tale', *Immunity*, 51(1), pp. 10–12. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.019.
- Drujont, L. *et al.* (2016) 'ROR γ t⁺ cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus', *Scientific Reports*, 6(1). doi: 10.1038/srep23682.
- Dudziak, D. *et al.* (2007) 'Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo', *Science*, 315(5808), pp. 107–111. doi: 10.1126/science.1136080.
- Duerr, R. H. *et al.* (2006) 'A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene', *Science*, 314(5804), pp. 1461–1463. doi: 10.1126/science.1135245.
- Durai, V. *et al.* (2018) 'Altered compensatory cytokine signaling underlies the discrepancy between *Flt3*^{-/-} and *Flt3l*^{-/-} mice', *The Journal of Experimental Medicine*, 215(5), pp. 1417–1435. doi: 10.1084/jem.20171784.
- Eberl, G. *et al.* (2004) 'An essential function for the nuclear receptor ROR γ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells', *Nature Immunology*, 5(1), pp. 64–73. doi: 10.1038/ni1022.

- Eberl, G. *et al.* (2015) 'Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology', *Science*, 348(6237), pp. aaa6566–aaa6566. doi: 10.1126/science.aaa6566.
- Eberl, G. (2017) 'ROR γ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces', *Mucosal Immunology*, 10(1), pp. 27–34. doi: 10.1038/mi.2016.86.
- Eisenbarth, S. C. (2019) 'Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function', *Nature Reviews Immunology*, 19(2), pp. 89–103. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1.
- Elser, B. *et al.* (2002) 'IFN γ Represses IL-4 Expression via IRF-1 and IRF-2', p. 10.
- Engel, I. *et al.* (2016) 'Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs', *Nature Immunology*, 17(6), pp. 728–739. doi: 10.1038/ni.3437.
- Engering, A. and Pieters, J. (2001) 'Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells', *International Immunology*, 13(2), pp. 127–134. doi: 10.1093/intimm/13.2.127.
- Erllich, Z. *et al.* (2019) 'Macrophages, rather than DCs, are responsible for inflammasome activity in the GM-CSF BMDC model', *Nature Immunology*, 20(4), pp. 397–406. doi: 10.1038/s41590-019-0313-5.
- Esterházy, D. *et al.* (2016) 'Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral Treg cells and tolerance', *Nature Immunology*, 17(5), pp. 545–555. doi: 10.1038/ni.3408.
- Fallas, J. L. *et al.* (2007) 'Expression Patterns of H2-O in Mouse B Cells and Dendritic Cells Correlate with Cell Function', *The Journal of Immunology*, 178(3), pp. 1488–1497. doi: 10.4049/jimmunol.178.3.1488.
- Feske, S., Wulff, H. and Skolnik, E. Y. (2015) 'Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity', *Annual Review of Immunology*, 33(1), pp. 291–353. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112212.
- Fung-Leung, W.P. *et al.* (1996) 'Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice', *Science*. doi: 271:1278–1281
- Firat, E. *et al.* (2007) 'The Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Aminopeptidase 1 in Immunity to Infection and in Cross-Presentation', *The Journal of Immunology*, 178(4), pp. 2241–2248. doi: 10.4049/jimmunol.178.4.2241.
- Fitzgerald, K. A. *et al.* (2001) 'Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction', *Nature*, 413(6851), pp. 78–83. doi: 10.1038/35092578.
- Fitzpatrick, L. R. *et al.* (2010) '4SC-101, a novel immunosuppressive drug, inhibits IL-17 and attenuates colitis in two murine models of inflammatory bowel disease⁺', *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(10), pp. 1763–1777. doi: 10.1002/ibd.21264.
- Fogg, D. K. (2006) 'A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells', *Science*, 311(5757), pp. 83–87. doi: 10.1126/science.1117729.
- Förster, R. *et al.* (1999) 'CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs', *Cell*, 99(1), pp. 23–33. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80059-8.
- Fourriere, L. *et al.* (2019) 'RAB6 and microtubules restrict protein secretion to focal adhesions', *The Journal of Cell Biology*, 218(7), pp. 2215–2231. doi: 10.1083/jcb.201805002.
- Fritz, J. H. *et al.* (2012) 'Acquisition of a multifunctional IgA⁺ plasma cell phenotype in the gut', *Nature*, 481(7380), pp. 199–203. doi: 10.1038/nature10698.

- Gadola, S.D. *et al.* (2000) 'Cerundolo TAP deficiency syndrome', *Clinical and Experimental Immunology*.
- Gálvez, J. (2014) 'Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD', *ISRN Inflammation*, 2014, pp. 1–14. doi: 10.1155/2014/928461.
- Gao, D. *et al.* (2017) 'Methylation of *TMEM176A* is an independent prognostic marker and is involved in human colorectal cancer development', *Epigenetics*, 12(7), pp. 575–583. doi: 10.1080/15592294.2017.1341027.
- Gao, Y. *et al.* (2013) 'Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells', *Immunity*, 39(4), pp. 722–732. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.028.
- Garrett, W. S. *et al.* (2000) 'Developmental Control of Endocytosis in Dendritic Cells by Cdc42', *Cell*, 102(3), pp. 325–334. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00038-6.
- Geremia, A. and Arancibia-Cárcamo, C. V. (2017) 'Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01296.
- Gerner, M. Y. *et al.* (2017) 'Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(10), pp. 3105–3122. doi: 10.1084/jem.20170335.
- Geuze, H.J. (1998) 'The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning' *Immunology Today*.
- Ghosh, H. S. *et al.* (2010) 'Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells', *Immunity*, 33(6), pp. 905–916. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.023.
- di Giovangiulio, M. *et al.* (2016) 'Vagotomy Affects the Development of Oral Tolerance and Increases Susceptibility to Develop Colitis Independently of α -7 Nicotinic Receptor', *Molecular Medicine*, doi: 10.2119/molmed.2016.00062.
- Global Lipids Genetics Consortium (2013) 'Discovery and refinement of loci associated with lipid levels', *Nature Genetics*, 45(11), pp. 1274–1283. doi: 10.1038/ng.2797.
- Gocke, A. R. *et al.* (2012) 'Kv1.3 Deletion Biases T Cells toward an Immunoregulatory Phenotype and Renders Mice Resistant to Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Immunology*, 188(12), pp. 5877–5886. doi: 10.4049/jimmunol.1103095.
- Gorer, P. A. (1936) 'The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group a serum', *Journal of Genetics*, 32(1), pp. 17–31. doi: 10.1007/BF02982499.
- Grajales-Reyes, G. E. *et al.* (2016) 'Batf3 maintains Irf8 autoactivation for commitment of a CD8 α ⁺ cDC clonogenic progenitor', p. 26.
- Greter, M., Helft, J., *et al.* (2012) 'GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells', *Immunity*, 36(6), pp. 1031–1046. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.027.
- Greter, M., Lelios, I., *et al.* (2012) 'Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia', *Immunity*, 37(6), pp. 1050–1060. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.001.
- Grunin, M. *et al.* (2016) 'Transcriptome Analysis on Monocytes from Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration', *Scientific Reports*, 6(1). doi: 10.1038/srep29046.
- Gunn, M. D. *et al.* (1998) 'A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), pp. 258–263. doi: 10.1073/pnas.95.1.258.

- Guttman-Yassky, E. *et al.* (2018) 'Efficacy and safety of fezakinumab (an IL-22 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by conventional treatments: A randomized, double-blind, phase 2a trial', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(5), pp. 872-881.e6. doi: 10.1016/j.jaad.2018.01.016.
- Hacker, C. *et al.* (2003) 'Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development', *Nature Immunology*, 4(4), pp. 380–386. doi: 10.1038/ni903.
- Hamada, H. *et al.* (2009) 'Tc17, a Unique Subset of CD8 T Cells That Can Protect against Lethal Influenza Challenge', *The Journal of Immunology*, 182(6), pp. 3469–3481. doi: 10.4049/jimmunol.0801814.
- Hambleton, S. *et al.* (2011) 'IRF8 Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency', *New England Journal of Medicine*, 365(2), pp. 127–138. doi: 10.1056/NEJMoa1100066.
- Hammond, C. *et al.* (1998) 'The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules', *Journal of Immunology*.
- Happel, K. I. *et al.* (2005) 'Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*', *The Journal of Experimental Medicine*, 202(6), pp. 761–769. doi: 10.1084/jem.20050193.
- Hari, A. *et al.* (2015) 'Redirecting soluble antigen for MHC class I cross-presentation during phagocytosis: Antigen processing', *European Journal of Immunology*, 45(2), pp. 383–395. doi: 10.1002/eji.201445156.
- Hasegawa, H. and Matsumoto, T. (2018) 'Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo', *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00350.
- He, Y.-W. *et al.* (1998) 'ROR γ t, a Novel Isoform of an Orphan Receptor, Negatively Regulates Fas Ligand Expression and IL-2 Production in T Cells', p. 10.
- Helft, J. *et al.* (2015) 'GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells', *Immunity*, 42(6), pp. 1197–1211. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.018.
- Hennies, C.M. Lehn, M.A. and Janssen, E.M. (2015) 'Quantitating MHC class II trafficking in primary dendritic cells using imaging flow cytometry', *Journal of Immunological Methods*, doi: 10.1016/j.jim.2015.04.023.
- Hepworth, M. R. *et al.* (2013) 'Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria', *Nature*, 498(7452), pp. 113–117. doi: 10.1038/nature12240.
- Hepworth, M. R. *et al.* (2015) 'Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4+ T cells', *Science*, 348(6238), pp. 1031–1035. doi: 10.1126/science.aaa4812.
- Hildner, K. *et al.* (2008) 'Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity', *Science*, 322(5904), pp 1097–1100. doi: 10.1126/science.1164206.
- Hodo, Y. *et al.* (2010) 'Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma', *Genomics*, 95(4), pp. 217–223. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.01.004.
- Hoebe, K. *et al.* (2003) 'Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling', *Nature*, 424(6950), pp. 743–748. doi: 10.1038/nature01889.
- Hofmann, M. W. *et al.* (1999) 'The Leucine-based Sorting Motifs in the Cytoplasmic Domain of the Invariant Chain Are Recognized by the Clathrin Adaptors AP1 and AP2 and their Medium Chains', *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), pp. 36153–36158. doi: 10.1074/jbc.274.51.36153.

- van den Hoorn, T. *et al.* (2012) 'Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression', *Journal of Cell Science*, 125(2), pp. 328–339. doi: 10.1242/jcs.088047.
- Hornell, T. M. C. *et al.* (2006) 'Human Dendritic Cell Expression of HLA-DO Is Subset Specific and Regulated by Maturation', *The Journal of Immunology*, 176(6), pp. 3536–3547. doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3536.
- Hornig, T. *et al.* (2002) 'The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors', *Nature*, 420(6913), pp. 329–333. doi: 10.1038/nature01180.
- Houde, M. *et al.* (2003) 'Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation', *Nature*, 425(6956), pp. 402–406. doi: 10.1038/nature01912.
- Hsing, L. C. and Rudensky, A. Y. (2005) 'The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation', *Immunological Reviews*, 207(1), pp. 229–241. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x.
- Hsu, S. *et al.* (2001) 'Fundamental Ca²⁺ Signaling Mechanisms in Mouse Dendritic Cells: CRAC Is the Major Ca²⁺ Entry Pathway', *The Journal of Immunology*, 166(10), pp. 6126–6133. doi: 10.4049/jimmunol.166.10.6126.
- Huang, W. *et al.* (2004) 'Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti- *Candida albicans* Host Defense in Mice', *The Journal of Infectious Diseases*, 190(3), pp. 624–631. doi: 10.1086/422329.
- Huber, M. *et al.* (2009) 'A Th17-like developmental process leads to CD8⁺ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity: HIGHLIGHTS', *European Journal of Immunology*, 39(7), pp. 1716–1725. doi: 10.1002/eji.200939412.
- Hueber, W. *et al.* (2012) 'Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial', *Gut*, 61(12), pp. 1693–1700. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301668.
- Iborra, S. *et al.* (2012) 'The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 122(5), pp. 1628–1643. doi: 10.1172/JCI60660.
- Inaba, K. (1992) 'Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor', *Journal of Experimental Medicine*, 176(6), pp. 1693–1702. doi: 10.1084/jem.176.6.1693.
- Ivanov, I. I. *et al.* (2006) 'The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells', *Cell*, 126(6), pp. 1121–1133. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035.
- Jain, R. W., Dang, A. K. and Kerfoot, S. M. (2016) 'Simple and Efficient Production and Purification of Mouse Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Studies', *Journal of Visualized Experiments*, (116), p. 54727.
- Jaitin, D. A. *et al.* (2014) 'Massively Parallel Single-Cell RNA-Seq for Marker-Free Decomposition of Tissues into Cell Types', *Science*, 343(6172), pp. 776–779. doi: 10.1126/science.1247651.
- de Jong, K. *et al.* (2015) 'Genome-wide interaction study of gene-by-occupational exposure and effects on FEV₁ levels', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(6), pp. 1664-1672.e14. doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.042.
- Jongbloed, S. L. *et al.* (2010) 'Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), pp. 1247–1260. doi: 10.1084/jem.20092140.
- Josien, R. *et al.* (1998) 'Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion', *Blood*.

- Kang, S. *et al.* (2015) 'Identification of nuclear hormone receptor pathways causing insulin resistance by transcriptional and epigenomic analysis', *Nature Cell Biology*, 17(1), pp. 44–56. doi: 10.1038/ncb3080.
- Kaplan, G. G. (2015) 'The global burden of IBD: from 2015 to 2025', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(12), pp. 720–727. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150.
- Kashiwada, M. *et al.* (2011) 'Rothman NFIL3-E4BP4 is a key transcription factor for CD8 α ⁺ dendritic cell development', *Blood*, doi: 10.1182/blood-2010-07-295873.
- Kawano, T. *et al.* (1997) 'CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V14 NKT Cells by Glycosylceramides', 278, p. 5.
- Kawasaki, T. and Kawai, T. (2014) 'Toll-like receptor signaling pathways' *Frontiers of Immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- Kim, D. *et al.* (2000) 'Regulation of Peripheral Lymph Node Genesis by the Tumor Necrosis Factor Family Member Trance', *The Journal of Experimental Medicine*, 192(10), pp. 1467–1478. doi: 10.1084/jem.192.10.1467.
- Kim, M. H., Taparowsky, E. J. and Kim, C. H. (2015) 'Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut', *Immunity*, 43(1), pp. 107–119. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.009.
- Kiss, E. A. *et al.* (2011) 'Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles', *Science*, 334(6062), pp. 1561–1565. doi: 10.1126/science.1214914.
- Klinkert, W. E. *et al.* (1980) 'Rat dendritic cells function as accessory cells and control the production of a soluble factor required for mitogenic responses of T lymphocytes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(9), pp. 5414–5418. doi: 10.1073/pnas.77.9.5414.
- Kloor, M. *et al.* (2005) 'Immunoselective Pressure and Human Leukocyte Antigen Class I Antigen Machinery Defects in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers', *Cancer Research*, 65(14), pp. 6418–6424. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0044.
- Klose, C.S. *et al.* (2013) 'A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ t⁺ innate lymphoid cells', *Nature*, doi: 10.1038/nature11813.
- Klose, C. S. N. and Artis, D. (2016) 'Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis', *Nature Immunology*, 17(7), pp. 765–774. doi: 10.1038/ni.3489.
- Koch, F. *et al.* (1996) 'High level IL-12 production by murine dendritic cells upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10', *Journal of Experimental Medicine*, doi: 10.1084/jem.184.2.741.
- Kohlgruber, A. C. *et al.* (2018) ' $\gamma\delta$ T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis', *Nature Immunology*, 19(5), pp. 464–474. doi: 10.1038/s41590-018-0094-2.
- Kondo, T. *et al.* (2009) 'Cutting Edge: Phenotypic Characterization and Differentiation of Human CD8⁺ T Cells Producing IL-17', *The Journal of Immunology*, 182(4), pp. 1794–1798. doi: 10.4049/jimmunol.0801347.
- Korn, T. *et al.* (2007) 'IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells', *Nature*, 448(7152), pp. 484–487. doi: 10.1038/nature05970.
- Kovacsovic-Bankowski, M. and Rock, K.L. (1995) 'A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules', *Science*, 10.1126/science.7809629.
- Kronenberg, M. (2005) 'TOWARD AN UNDERSTANDING OF NKT CELL BIOLOGY: Progress and Paradoxes', *Annual Review of Immunology*, 23(1), pp. 877–900. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115742.

- Kruglov, A.A. *et al.* (2013) 'Nonredundant function of soluble LT α 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis', *Science*, doi: 10.1126/science.1243364.
- Kuipers, H. F. *et al.* (2005) 'Statins Affect Cell-Surface Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules by Disrupting Cholesterol-Containing Microdomains', *Human Immunology*, 66(6), pp. 653–665. doi: 10.1016/j.humimm.2005.04.004.
- Langrish, C. L. *et al.* (2005) 'IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation', *The Journal of Experimental Medicine*, 201(2), pp. 233–240. doi: 10.1084/jem.20041257.
- Lautwein, A. *et al.* (2002) 'Inflammatory stimuli recruit cathepsin activity to late endosomal compartments in human dendritic cells', *European Journal of Immunology*, 32(12), pp. 3348–3357. doi: 10.1002/1521-4141(200212)32:12<3348::AID-IMMU3348>3.0.CO;2-S.
- Lázaro, S. Gamarra, D. Del Va, I. M. (2015) 'Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: A guerrilla army that partners with the proteasome' *Molecular Immunology*, doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.014.
- Lee, J. S. *et al.* (2012) 'AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch', *Nature Immunology*, 13(2), pp. 144–151. doi: 10.1038/ni.2187.
- Lee, J. S. *et al.* (2015) 'Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability', *Immunity*, 43(4), pp. 727–738. doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.003.
- Leffers, N. *et al.* (2009) 'Down-regulation of proteasomal subunit MB1 is an independent predictor of improved survival in ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*, 113(2), pp. 256–263. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.12.030.
- Lemoine, A. *et al.* (2016) 'Generation of a Double KO Mouse by Simultaneous Targeting of the Neighboring Genes Tmem176a and Tmem176b Using CRISPR/Cas9: Key Steps from Design to Genotyping', *Journal of Genetics and Genomics*, 43(5), pp. 329–340. doi: 10.1016/j.jgg.2016.04.004.
- Leone, P. *et al.* (2013) 'MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells', *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 105(16), pp. 1172–1187. doi: 10.1093/jnci/djt184.
- Lewis, R. S. and Cahalan, M. D. (1989) 'Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells', *CELL REGULATION*, 1, p. 14.
- Li, H. *et al.* (2018) 'Epigenetic silencing of TMEM176A activates ERK signaling in human hepatocellular carcinoma', *Clinical Epigenetics*, 10(1). doi: 10.1186/s13148-018-0570-4.
- Lim, J. P. and Gleeson, P. A. (2011) 'Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps', *Immunology and Cell Biology*, 89(8), pp. 836–843. doi: 10.1038/icb.2011.20.
- Lindemans, C. A. *et al.* (2015) 'Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration', *Nature*, 528(7583), pp. 560–564. doi: 10.1038/nature16460.
- Liu, K. *et al.* (2007) 'Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice', *Nature Immunology*, 8(6), pp. 578–583. doi: 10.1038/ni1462.
- Liu, K. *et al.* (2009) 'In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis', *Science*. doi: 10.1126/science.1170540.
- Liu, Z. *et al.* (2018) 'Potential targets of TMEM176A in the growth of glioblastoma cells', *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, pp. 7763–7775. doi: 10.2147/OTT.S179725.

- Lizée, G. *et al.* (2003) 'Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain', *Nature Immunology*, 4(11), pp. 1065–1073. doi: 10.1038/ni989.
- Lochner, M. *et al.* (2008) 'In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17⁺ and regulatory IL-10⁺ Foxp3⁺ RORγt⁺ T cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6), pp. 1381–1393. doi: 10.1084/jem.20080034.
- Longphre, M. *et al.* (1999) 'Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells', *Journal of Clinical Investigation*, 104(10), pp. 1375–1382. doi: 10.1172/JCI6097.
- Louvet, C. *et al.* (2005) 'Identification of a New Member of the CD20/FcεpsilonRIβ Family Overexpressed in Tolerated Allografts', *American Journal of Transplantation*, 5(9), pp. 2143–2153. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01007.x.
- Lurton, J. *et al.* (1999) 'Isolation of a Gene Product Expressed by a Subpopulation of Human Lung Fibroblasts by Differential Display', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20(2), pp. 327–331. doi: 10.1165/ajrcmb.20.2.3368.
- Lyman, S. D. *et al.* (1993) 'Molecular cloning of a ligand for the flt3flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells', *Cell*, 75(6), pp. 1157–1167. doi: 10.1016/0092-8674(93)90325-K.
- Macagno, A. *et al.* (1999) 'Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation', *European Journal of Immunology*, 29(12), pp. 4037–4042. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<4037::AID-IMMU4037>3.0.CO;2-T.
- Maeda, Y. *et al.* (2006) 'Role of Clast1 in development of cerebellar granule cells', *Brain Research*, 1104(1), pp. 18–26. doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.068.
- Maldonado-Lopez, R. (1999) 'CD8α⁺ and CD8α⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo', *Journal of Experimental Medicine*, doi: 10.1084/jem.189.3.587.
- Manel, N., Unutmaz, D. and Littman, D. R. (2008) 'The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor-β and induction of the nuclear receptor RORγt', *Nature Immunology*, 9(6), pp. 641–649. doi: 10.1038/ni.1610.
- Maraskovsky, E. (1996) 'Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified', *Journal of Experimental Medicine*, 184(5), pp. 1953–1962. doi: 10.1084/jem.184.5.1953.
- Martin, J. C. *et al.* (2017) 'Limited Presence of IL-22 Binding Protein, a Natural IL-22 Inhibitor, Strengthens Psoriatic Skin Inflammation', *The Journal of Immunology*, 198(9), pp. 3671–3678. doi: 10.4049/jimmunol.1700021.
- Maschalidi, S. *et al.* (2017) 'UNC93B1 interacts with the calcium sensor STIM1 for efficient antigen cross-presentation in dendritic cells', *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01601-5.
- McKenna, H. J. *et al.* (2000) 'Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells', 95(11), p. 9.
- Melnikova, V. I. *et al.* (2010) 'Ontogenesis of rat immune system: Proteasome expression in different cell populations of the developing thymus', *Cellular Immunology*, 266(1), pp. 83–89. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.09.001.
- Melo-Gonzalez, F. *et al.* (2019) 'Antigen-presenting ILC3 regulate T cell-dependent IgA responses to colonic mucosal bacteria', *The Journal of Experimental Medicine*, 216(4), pp. 728–742. doi: 10.1084/jem.20180871.
- Mende, I. *et al.* (2006) 'Flk2⁺ myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells', 107(4), p. 9.

- Merad, M. (2010) 'PU.1 Takes Control of the Dendritic Cell Lineage', *Immunity*, 32(5), pp. 583–585. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.006.
- Merad, M. *et al.* (2013) 'The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting', *Annual Review of Immunology*, 31(1), pp. 563–604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Meredith, M. M. *et al.* (2012) 'Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage', *The Journal of Experimental Medicine*, 209(6), pp. 1153–1165. doi: 10.1084/jem.20112675.
- Mestecky, J., Russell, M. W. and Elson, C. O. (1999) 'Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface', *Gut*, 44(1), pp. 2–5. doi: 10.1136/gut.44.1.2.
- Michel, M.-L. *et al.* (2007) 'Identification of an IL-17–producing NK1.1^{neg} iNKT cell population involved in airway neutrophilia', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(5), pp. 995–1001. doi: 10.1084/jem.20061551.
- Michel, M.-L. *et al.* (2008) 'Critical role of ROR- γ t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), pp. 19845–19850. doi: 10.1073/pnas.0806472105.
- Mielke, L.A. *et al.* (2013) 'Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation', *Journal of Experimental Medicine*, doi: 10.1084/jem.20121588.
- Moreau, A. *et al.* (2009) 'Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates' *FASEB Journal*, doi: 10.1096/fj.08-128173.
- Moreau, A. *et al.* (2012) 'Tolerogenic dendritic cells and negative vaccination in transplantation: from rodents to clinical trials', *Frontiers in Immunology*, 3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00218.
- Moreau, A. *et al.* (2017) 'Tolerogenic dendritic cell therapy in organ transplantation', *Transplant International*, 30(8), pp. 754–764. doi: 10.1111/tri.12889.
- Morrison, L. A. (1986) 'Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II- restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones', *Journal of Experimental Medicine*, 163(4), pp. 903–921. doi: 10.1084/jem.163.4.903.
- Mosmann, T. R. *et al.* (1986) 'Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.', p. 11.
- Moti, N. *et al.* (2019) 'Wnt traffic from endoplasmic reticulum to filopodia', *PLOS ONE*. Edited by Y. Li, 14(2), p. e0212711. doi: 10.1371/journal.pone.0212711.
- Mueller, S. N. (2017) 'Spreading the load: Antigen transfer between migratory and lymph node-resident dendritic cells promotes T-cell priming', *European Journal of Immunology*, 47(10), pp. 1798–1801. doi: 10.1002/eji.201747248.
- Naik, S.H. *et al.* (2005) 'Cutting edge generation of splenic CD8+ and CD8– dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures', *Journal of Immunology*, doi: 10.4049/jimmunol.174.11.6592.
- Nakajima, H. *et al.* (2002) 'Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria', *Kidney International*, 61(5), pp. 1577–1587. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00300.x.
- Nakano, H., Yanagita, M. and Gunn, M. D. (2001) 'CD11c⁺B220⁺Gr-1⁺ Cells in Mouse Lymph Nodes and Spleen Display Characteristics of Plasmacytoid Dendritic Cells', p. 8.

- Neefjes, J. *et al.* (2011) 'Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation', *Nature Reviews Immunology*, 11(12), pp. 823–836. doi: 10.1038/nri3084.
- Neefjes, J. J. *et al.* (1990) 'The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route', *Cell*, 61(1), pp. 171–183. doi: 10.1016/0092-8674(90)90224-3.
- Neill, D. R. *et al.* (2010) 'Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity', *Nature*, 464(7293), pp. 1367–1370. doi: 10.1038/nature08900.
- Nickles, D. *et al.* (2013) 'Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls', *Human Molecular Genetics*, 22(20), pp. 4194–4205. doi: 10.1093/hmg/ddt267.
- van Niel, G. *et al.* (2006) 'Dendritic Cells Regulate Exposure of MHC Class II at Their Plasma Membrane by Oligoubiquitination', *Immunity*, 25(6), pp. 885–894. doi: 10.1016/j.immuni.2006.11.001.
- Nishiya, T. and DeFranco, A. L. (2004) 'Ligand-regulated Chimeric Receptor Approach Reveals Distinctive Subcellular Localization and Signaling Properties of the Toll-like Receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), pp. 19008–19017. doi: 10.1074/jbc.M311618200.
- Nuchtern, J. G. *et al.* (1989) 'Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation', *Nature*, 339(6221), pp. 223–226. doi: 10.1038/339223a0.
- Nunes-Hasler, P. *et al.* (2017) 'STIM1 promotes migration, phagosomal maturation and antigen cross-presentation in dendritic cells' *Nature Communications*, doi: 10.1038/s41467-017-01600-6.
- Ogawa, A. *et al.* (2004) 'Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice', *Clinical Immunology*, 110(1), pp. 55–62. doi: 10.1016/j.clim.2003.09.013.
- Onai, N. *et al.* (2013) 'A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential', *Immunity*, 38(5), pp. 943–957. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.006.
- Oppmann, B. *et al.* (2000) 'Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12', *Immunity*, 13(5), pp. 715–725. doi: 10.1016/S1074-7613(00)00070-4.
- Otsubo, T. *et al.* (2014) 'Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells', *Cancer Science*, 105(5), pp. 560–567. doi: 10.1111/cas.12394.
- Pantelyushin, S. *et al.* (2012) 'Roryt+ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 122(6), pp. 2252–2256. doi: 10.1172/JCI61862.
- Patente, T. A. *et al.* (2019) 'Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.03176.
- Paul, P. *et al.* (2011) 'A Genome-wide Multidimensional RNAi Screen Reveals Pathways Controlling MHC Class II Antigen Presentation', *Cell*, 145(2), pp. 268–283. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.023.
- Penny, H. A., Hodge, S. H. and Hepworth, M. R. (2018) 'Orchestration of intestinal homeostasis and tolerance by group 3 innate lymphoid cells', *Seminars in Immunopathology*, 40(4), pp. 357–370. doi: 10.1007/s00281-018-0687-8.
- Perrin, P. *et al.* (2019) 'The labyrinth unfolds: architectural rearrangements of the endolysosomal system in antigen-presenting cells', *Current Opinion in Immunology*, 58, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.coi.2018.12.004.
- Peters, P. J. *et al.* (1991) 'Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments', *Nature*, 349(6311), pp. 669–676. doi: 10.1038/349669a0.

- Pham, T. A. N. *et al.* (2014) 'Epithelial IL-22RA1-Mediated Fucosylation Promotes Intestinal Colonization Resistance to an Opportunistic Pathogen', *Cell Host & Microbe*, 16(4), pp. 504–516. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.017.
- Pickard, J. M. *et al.* (2014) 'Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host–commensal symbiosis in sickness', *Nature*, 514(7524), pp. 638–641. doi: 10.1038/nature13823.
- Platt, C. D. *et al.* (2010) 'Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), pp. 4287–4292. doi: 10.1073/pnas.0910609107.
- Pooley, J.L. Heath, W.R. and Shortman, K. (2001) 'Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells' *Journal of immunology*, doi: 10.4049/jimmunol.166.9.5327.
- Puhr, S. *et al.* (2015) 'Dendritic cell development—History, advances, and open questions', *Seminars in Immunology*, 27(6), pp. 388–396. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.012.
- Pulendran, B. *et al.* (1999) 'Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3), pp. 1036–1041. doi: 10.1073/pnas.96.3.1036.
- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2009) 'The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins', *Nature*, 458(7237), pp. 445–452. doi: 10.1038/nature07961.
- Rankin, L. C. *et al.* (2016) 'Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells', *Nature Immunology*, 17(2), pp. 179–186. doi: 10.1038/ni.3332.
- Reboldi, A. *et al.* (2016) 'IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches', *Science*, 352(6287), pp. aaf4822–aaf4822. doi: 10.1126/science.aaf4822.
- Reis e Sousa, C. (2004) 'Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity', *Current Opinion in Immunology*, 16(1), pp. 21–25. doi: 10.1016/j.coi.2003.11.007.
- Reis e Sousa, C. (2006) 'Dendritic cells in a mature age', *Nature Reviews Immunology*, 6(6), pp. 476–483. doi: 10.1038/nri1845.
- Reith, W., LeibundGut-Landmann, S. and Waldburger, J.-M. (2005) 'Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator', *Nature Reviews Immunology*, 5(10), pp. 793–806. doi: 10.1038/nri1708.
- Roche, P.A. and Furuta, K. (2015) 'The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation', *Nature Reviews Immunology*, doi: 10.1038/nri3818.
- Reynolds, G. and Haniffa, M. (2015) 'Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species?', *Frontiers in Immunology*, 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00330.
- Riberdy, J. M. *et al.* (1992) 'HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides', *Nature*, 360(6403), pp. 474–477. doi: 10.1038/360474a0.
- Robinette, M. *et al.* (2015) 'Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets', *Nature Immunology*, 16(3), pp. 306–317. doi: 10.1038/ni.3094.
- Rocha, N. *et al.* (2009) 'Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150^{Glued} and late endosome positioning', *The Journal of Cell Biology*, 185(7), pp. 1209–1225. doi: 10.1083/jcb.200811005.
- Roche, P. A. *et al.* (1993) 'Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), pp. 8581–8585. doi: 10.1073/pnas.90.18.8581.

- Roche, P. A. and Furuta, K. (2015) 'The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation', *Nature Reviews Immunology*, 15(4), pp. 203–216. doi: 10.1038/nri3818.
- Rock, K.L. *et al.* (2014) 'MHC class I-presented peptides and the DRiP hypothesis' *Trends Immunology*, doi: 10.1016/j.it.2014.01.002.
- Rodrigues, P. F. *et al.* (2018) 'Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells', *Nature Immunology*, 19(7), pp. 711–722. doi: 10.1038/s41590-018-0136-9.
- Sadasivan, B. *et al.* (1996) 'Roles for Calreticulin and a Novel Glycoprotein, Tapasin, in the Interaction of MHC Class I Molecules with TAP', *Immunity*, 5(2), pp. 103–114. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80487-2.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) 'Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha', *Journal of Experimental Medicine*, doi: 10.1084/jem.179.4.1109.
- Sancho, D. *et al.* (2009) 'Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity' *Nature*, doi: 10.1038/nature07750.
- Sands, B. E. *et al.* (2017) 'Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study', *Gastroenterology*, 153(1), pp. 77-86.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2017.03.049.
- Sanos, S. L. *et al.* (2009) 'ROR γ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells', *Nature Immunology*, 10(1), pp. 83–91. doi: 10.1038/ni.1684.
- Satoh-Takayama, N. *et al.* (2008) 'Microbial Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46+ Cells that Provide Innate Mucosal Immune Defense', *Immunity*, 29(6), pp. 958–970. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.001.
- Satpathy, A. T. *et al.* (2012) 'Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages', *The Journal of Experimental Medicine*, 209(6), pp. 1135–1152. doi: 10.1084/jem.20120030.
- Savina, A. *et al.* (2006) 'NOX2 Controls Phagosomal pH to Regulate Antigen Processing during Crosspresentation by Dendritic Cells', *Cell*, 126(1), pp. 205–218. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.035.
- Savina, A. *et al.* (2009) 'The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells', *Immunity*, doi: 10.1016/j.immuni.2009.01.013.
- Schlitzer, A. *et al.* (2015) 'Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow', *Nature Immunology*, 16(7), pp. 718–728. doi: 10.1038/ni.3200.
- Schmid, C. D. *et al.* (2009) 'Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: *in vitro* versus *in vivo*', *Journal of Neurochemistry*, 109, pp. 117–125. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05984.x.
- Schmid, D., Pypaert, M. and Münz, C. (2008) 'MHC class II antigen loading compartments continuously receive input from autophagosomes', p. 29.
- Schmitt, L. and Tampé, R. (2002) 'Structure and mechanism of ABC transporters', p. 7.
- Schönheit, J. *et al.* (2013) 'PU.1 Level-Directed Chromatin Structure Remodeling at the Irf8 Gene Drives Dendritic Cell Commitment', *Cell Reports*, 3(5), pp. 1617–1628. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.007.
- Segovia, M. *et al.* (2010) 'Preparation of mouse bone marrow-derived dendritic cells with immunoregulatory properties' *Methods in Molecular Biology*, doi: 10.1007/978-1-60761-869-0_11.

- Segovia, M. *et al.* (2014) 'Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival Through *Tmem176b* -Dependent Antigen Cross-Presentation: Immunoregulatory Mechanisms of Autologous DCs', *American Journal of Transplantation*, 14(5), pp. 1021–1031. doi: 10.1111/ajt.12708.
- Segovia, M. *et al.* (2019) 'Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation', *Cancer Cell*, 35(5), pp. 767-781.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2019.04.003.
- Segura, E. (2016) 'Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets', in Segura, E. and Onai, N. (eds) *Dendritic Cell Protocols*. New York, NY: Springer New York, pp. 3–15. doi: 10.1007/978-1-4939-3606-9_1.
- Segura, E. and Amigorena, S. (2013) 'Inflammatory dendritic cells in mice and humans', *Trends in Immunology*, 34(9), pp. 440–445. doi: 10.1016/j.it.2013.06.001.
- Segura, E., Durand, M. and Amigorena, S. (2013) 'Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 210(5), pp. 1035–1047. doi: 10.1084/jem.20121103.
- Shang, A. *et al.* (2018) 'Downregulation of TMEM176A suppresses cell growth and proliferation in non-small cell lung cancer', p. 9.
- Shen, L. *et al.* (2004) 'Important Role of Cathepsin S in Generating Peptides for TAP-Independent MHC Class I Crosspresentation In Vivo', *Immunity*, 21(2), pp. 155–165. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.004.
- Shin, J.-S. *et al.* (2006) 'Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination', *Nature*, 444(7115), pp. 115–118. doi: 10.1038/nature05261.
- Shortman, K. and Liu, Y.-J. (2002) 'Mouse and human dendritic cell subtypes', *Nature Reviews Immunology*, 2(3), pp. 151–161. doi: 10.1038/nri746.
- Shui, W. *et al.* (2008) 'Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), pp. 16952–16957. doi: 10.1073/pnas.0809218105.
- Silvano, A. (2015) 'Dendritic cells: phenotypic and functional heterogeneity', *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, Vol 119, p. No 3 (2014)-. doi: 10.13128/ijae-15563.
- Smith, J. A. (2015) 'Update on Ankylosing Spondylitis: Current Concepts in Pathogenesis', *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(1). doi: 10.1007/s11882-014-0489-6.
- Song, C. *et al.* (2015) 'Unique and redundant functions of NKp46⁺ ILC3s in models of intestinal inflammation', *The Journal of Experimental Medicine*, 212(11), pp. 1869–1882. doi: 10.1084/jem.20151403.
- Sonnenberg, G. F. *et al.* (2012) 'Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria', *Science*, 336(6086), pp. 1321–1325. doi: 10.1126/science.1222551.
- Sozzani, S. (2005) 'Dendritic cell trafficking: More than just chemokines', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(6), pp. 581–592. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.008.
- Spencer, S. P. *et al.* (2014) 'Adaptation of Innate Lymphoid Cells to a Micronutrient Deficiency Promotes Type 2 Barrier Immunity', *Science*, 343(6169), pp. 432–437. doi: 10.1126/science.1247606.
- Spits, H. *et al.* (2013) 'Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature', *Nature Reviews Immunology*, 13(2), pp. 145–149. doi: 10.1038/nri3365.
- Steinman, R. M. *et al.* (1980) 'Dendritic Cells of the Mouse: Identification and Characterization', *Journal of Investigative Dermatology*, 75(1), pp. 14–16. doi: 10.1111/1523-1747.ep12521052.

- Steinman, R. M. (2000) 'The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells', *Journal of Experimental Medicine*, 191(3), pp. 411–416. doi: 10.1084/jem.191.3.411.
- Steinman, R. M., Adams, J. C. and Cohn, Z. A. (1976) 'IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE', p. 17.
- Steinman, R. M., Hawiger, D. and Nussenzweig, M. C. (2003) 'TOLERANT DENDRITIC CELLS', *Annual Review of Immunology*, 21(1), pp. 685–711. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040.
- Steinman, R. M. and Witmer, M. D. (1978) 'Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), pp. 5132–5136. doi: 10.1073/pnas.75.10.5132.
- Stuart, L. M. and Ezekowitz, R. A. B. (2005) 'Phagocytosis', *Immunity*, 22(5), pp. 539–550. doi: 10.1016/j.immuni.2005.05.002.
- Stumptner-Cuvelette, P. *et al.* (2001) 'HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), pp. 12144–12149. doi: 10.1073/pnas.221256498.
- Sugimoto, K. *et al.* (2008) 'IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI33194.
- Sumoza-Toledo, A. (2014) 'Regulation of Murine Dendritic Cell Functions by Calcium Channels', *SOJ Immunology*, 2(2). doi: 10.15226/soji/2/2/00113.
- Sun, Z. *et al.* (2000) 'Requirement for ROR γ t in Thymocyte Survival and Lymphoid Organ Development', *Science*, doi: 10.1126/science.288.5475.2369.
- Sun, Y. *et al.* (2018) 'RNA-sequencing study of peripheral blood mononuclear cells in sporadic Ménière's disease patients: possible contribution of immunologic dysfunction to the development of this disorder: Immunological dysfunction in Ménière's disease', *Clinical & Experimental Immunology*, 192(1), pp. 33–45. doi: 10.1111/cei.13083.
- Sutton, C. *et al.* (2006) 'A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis', *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), pp. 1685–1691. doi: 10.1084/jem.20060285.
- Sutton, C. E. *et al.* (2009) 'Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity', *Immunity*, 31(2), pp. 331–341. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.001.
- Swain, S. L., Weinberg, A. D. and Huston, G. (1990) 'IL-4 DIRECTS THE DEVELOPMENT OF Th2-LIKE HELPER EFFECTORS', p. 12.
- Tada, T. (1978) 'Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of I_a⁻ and I_a⁺ helper T cells', *Journal of Experimental Medicine*, 147(2), pp. 446–458. doi: 10.1084/jem.147.2.446.
- Taga, K. and Tosato, G. (1992) 'IL-10 INHIBITS HUMAN T CELL PROLIFERATION AND IL-2 PRODUCTION', p. 7.
- Tan, L. *et al.* (2019) 'Single-Cell Transcriptomics Identifies the Adaptation of Scart1⁺ V γ 6⁺ T Cells to Skin Residency as Activated Effector Cells', *Cell Reports*, 27(12), pp. 3657–3671.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.064.
- Teyton, L. *et al.* (1990) 'Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways', *Nature*, 348(6296), pp. 39–44. doi: 10.1038/348039a0.

- Thaçi, D. *et al.* (2015) 'Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate to severe plaque psoriasis: CLEAR, a randomized controlled trial', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(3), pp. 400–409. doi: 10.1016/j.jaad.2015.05.013.
- Theisen, D. J. *et al.* (2018) 'WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens', *Science*, 362(6415), pp. 694–699. doi: 10.1126/science.aat5030.
- Thorsby, E. (2009) 'A short history of HLA', *Tissue Antigens*, 74(2), pp. 101–116. doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x.
- Tivol, E. A. *et al.* (1995) 'Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4', *Immunity*, 3(5), pp. 541–547. doi: 10.1016/1074-7613(95)90125-6.
- Traver, D. *et al.* (2000) 'Development of CD8⁺-Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor', *Science*, 290(5499), pp. 2152–2154. doi: 10.1126/science.290.5499.2152.
- Tse, S. M. L. *et al.* (2003) 'Differential Role of Actin, Clathrin, and Dynamin in Fcγ Receptor-mediated Endocytosis and Phagocytosis', *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), pp. 3331–3338. doi: 10.1074/jbc.M207966200.
- Tze, L. E. *et al.* (2011) 'CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10–driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(1), pp. 149–165. doi: 10.1084/jem.20092203.
- Urban, J. F. *et al.* (1998) 'IL-13, IL-4R α , and Stat6 Are Required for the Expulsion of the Gastrointestinal Nematode Parasite *Nippostrongylus brasiliensis*', p. 10.
- Vaeth, M. *et al.* (2015) 'Ca²⁺ Signaling but Not Store-Operated Ca²⁺ Entry Is Required for the Function of Macrophages and Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 195(3), pp.
- Vaeth, M. and Feske, S. (2018) 'Ion channelopathies of the immune system', *Current Opinion in Immunology*, 52, pp. 39–50. doi: 10.1016/j.coi.2018.03.021.
- van den Hoorn, T., *et al.* (2012) Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression. *J. Cell Sci.* **125**, 328–339.
- Van Voorhis, W. (1982) 'Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood', *Journal of Experimental Medicine*, 155(4), pp. 1172–1187. doi: 10.1084/jem.155.4.1172.
- Vanden Berghe, T. *et al.* (2015) 'Passenger Mutations Confound Interpretation of All Genetically Modified Congenic Mice', *Immunity*, 43(1), pp. 200–209. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.011.
- Vandenbon, A. *et al.* (2016) 'Immuno-Navigator, a batch-corrected coexpression database, reveals cell type-specific gene networks in the immune system', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(17), pp. E2393–E2402. doi: 10.1073/pnas.1604351113.
- Vandier, C. and Velge-Roussel, F. (2018) 'Regulation of human dendritic cell immune functions by ion channels', *Current Opinion in Immunology*, 52, pp. 27–31. doi: 10.1016/j.coi.2018.03.011.
- Veldhoen, M. *et al.* (2006) 'TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells', *Immunity*, 24(2), pp. 179–189. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- Veldhoen, M. (2017) 'Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity', *Nature Immunology*, 18(6), pp. 612–621. doi: 10.1038/ni.3742.

- Vély, F. *et al.* (2016) 'Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans', *Nature Immunology*, 17(11), pp. 1291–1299. doi: 10.1038/ni.3553.
- Villadangos, J. A. *et al.* (2001) 'MHC Class II Expression Is Regulated in Dendritic Cells Independently of Invariant Chain Degradation', *Immunity*, 14(6), pp. 739–749. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00148-0.
- Villani, A.-C. *et al.* (2017) 'Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors', *Science*, 356(6335), p. eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573.
- Vivier, E. *et al.* (2018) 'Innate Lymphoid Cells: 10 Years On', *Cell*, 174(5), pp. 1054–1066. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.017.
- Voorthuis, J. A. C. *et al.* (2008) 'Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats', *Clinical & Experimental Immunology*, 81(2), pp. 183–188. doi: 10.1111/j.1365-2249.1990.tb03315.x.
- Vremec, D. *et al.* (2000) 'CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen', *The Journal of Immunology*, 164(6), pp. 2978–2986. doi: 10.4049/jimmunol.164.6.2978.
- Wang, C. *et al.* (2001) 'TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK', *Nature*, 412(6844), pp. 346–351. doi: 10.1038/35085597.
- Wang, Y. *et al.* (2002) 'Large Scale Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Associated Antigens by Autoantibodies', *The Journal of Immunology*, 169(2), pp. 1102–1109. doi: 10.4049/jimmunol.169.2.1102.
- Wang, Y. *et al.* (2008) 'Th2 Lymphoproliferative Disorder of *Lat*^{Y136F} Mutant Mice Unfolds Independently of TCR-MHC Engagement and Is Insensitive to the Action of Foxp3⁺ Regulatory T Cells', *The Journal of Immunology*, 180(3), pp. 1565–1575. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1565.
- Wang, Yiguang *et al.* (2017) 'Digitization of Endocytic pH by Hybrid Ultra-pH-Sensitive Nanoprobes at Single-Organelle Resolution', *Advanced Materials*, 29(1), p. 1603794. doi: 10.1002/adma.201603794.
- Wang, Ying *et al.* (2017) 'Epigenetic silencing of TMEM176A promotes esophageal squamous cell cancer development', *Oncotarget*, 8(41). doi: 10.18632/oncotarget.19550.
- West, M. A. (2004) 'Enhanced Dendritic Cell Antigen Capture via Toll-Like Receptor-Induced Actin Remodeling', *Science*, 305(5687), pp. 1153–1157. doi: 10.1126/science.1099153.
- Whiters, D.R. *et al.* (2016) 'Transient inhibition of ROR- γ t therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells', *Nature Medicine*, doi: 10.1038/nm.4046.
- Wilson, N. S. (2004) 'Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis', *Blood*, 103(6), pp. 2187–2195. doi: 10.1182/blood-2003-08-2729.
- Wirtz, S. *et al.* (2017) 'Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation', *Nature Protocols*, 12(7), pp. 1295–1309. doi: 10.1038/nprot.2017.044.
- Wlodarska, M. *et al.* (2011) 'Antibiotic Treatment Alters the Colonic Mucus Layer and Predisposes the Host to Exacerbated *Citrobacter rodentium* -Induced Colitis', *Infection and Immunity*. Edited by A. J. Bäuml, 79(4), pp. 1536–1545. doi: 10.1128/IAI.01104-10.
- Wong, U. and Cross, R. K. (2019) 'Expert opinion on interleukin-12/23 and interleukin-23 antagonists as potential therapeutic options for the treatment of inflammatory bowel disease', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(5), pp. 473–479. doi: 10.1080/13543784.2019.1597053.

- Wu, X. *et al.* (2013) 'Bcl11a Controls Flt3 Expression in Early Hematopoietic Progenitors and Is Required for pDC Development In Vivo', *PLoS ONE*. Edited by S. Kovats, 8(5), p. e64800. doi: 10.1371/journal.pone.0064800.
- Yamano, T. *et al.* (2019) 'Aire-expressing ILC3-like cells in the lymph node display potent APC features', *The Journal of Experimental Medicine*, 216(5), pp. 1027–1037. doi: 10.1084/jem.20181430.
- Yewdell, J.W. Schubert, U. Bennink, J.R (2001) 'At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules' *Journal of Cell Science*, doi: 114: 845-851.
- Yen, D. *et al.* (2006) 'IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6', *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), pp. 1310–1316. doi: 10.1172/JCI21404.
- Zeelenberg, I. S. *et al.* (2008) 'Targeting Tumor Antigens to Secreted Membrane Vesicles *In vivo* Induces Efficient Antitumor Immune Responses', *Cancer Research*, 68(4), pp. 1228–1235. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3163.
- Zenewicz, L. A. *et al.* (2008) 'Innate and Adaptive Interleukin-22 Protects Mice from Inflammatory Bowel Disease', *Immunity*, 29(6), pp. 947–957. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.003.
- Zheng, Y. *et al.* (2008) 'Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens', *Nature Medicine*, 14(3), pp. 282–289. doi: 10.1038/nm1720.
- Zhou, L. *et al.* (2019) 'Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2', *Nature*, 568(7752), pp. 405–409. doi: 10.1038/s41586-019-1082-x.
- Ziegler, K. and Unanue, E. R. (1981) 'Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes.', 127, p. 8.
- Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1974) 'Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system', *Nature*, 248(5450), pp. 701–702. doi: 10.1038/248701a0.
- Zuccolo, J. *et al.* (2010) 'Phylogenetic Analysis of the MS4A and TMEM176 Gene Families', *PLoS ONE*. Edited by S. D. Fugmann, 5(2), p. e9369. doi: 10.1371/journal.pone.0009369.
- Zwart, W. *et al.* (2005) 'Spatial Separation of HLA-DM/HLA-DR Interactions within MIIC and Phagosome-Induced Immune Escape', *Immunity*, 22(2), pp. 221–233. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.006.

Titre : Etude du rôle des gènes homologues *Tmem176a* et *Tmem176b* dans le système immunitaire : immunité de type 17 et biologie des cellules dendritiques

Mots clés : TMEM176A/B - ROR γ t - Immunité de type 17 - Cellules dendritiques - Présentation antigénique - CMH II

Résumé : Notre système immunitaire assure la protection et régule l'homéostasie de l'organisme. Pour cela, il se compose d'une réponse immune innée et d'une réponse adaptative. Notre équipe a identifié TMEM176A et TMEM176B, deux protéines transmembranaires de structure et de fonction identiques. Ces protéines sont des canaux ioniques intracellulaires qui ont la particularité d'être fortement exprimés à la fois dans les cellules ROR γ t⁺ et dans les cellules dendritiques. La génération d'une souris déficiente pour ces deux gènes nous a permis d'étudier leur rôle. Nous avons mis en évidence que l'absence de *Tmem176a* et *b* n'impacte pas la génération des cellules ROR γ t⁺, ni leur capacité à sécréter des cytokines. L'étude de deux modèles de colite nous a permis de

confirmer que *Tmem176a* et *b* ne semblent pas avoir un rôle majeur dans ces cellules. A l'inverse l'étude épigénétique des cellules dendritiques déficientes a mis en évidence une dérégulation de la voie de présentation du CMH de classe II. Nous avons mis en évidence une diminution de leur prolifération des lymphocytes T CD4⁺. En utilisant une technique de microscopie innovante, nous avons observé une localisation préférentielle de TMEM176A et B dans la voie endo-lysosomale et notamment dans le compartiment MIIC impliqué dans la présentation des antigènes par la voie du CMH de classe II. Ainsi ces résultats suggèrent que dans les cellules dendritiques, *Tmem176a* et *b* participent à la présentation des antigènes et à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naifs.

Title : Study of the role of homologous genes *Tmem176a* and *Tmem176b* in the immune system: type 17 immunity and dendritic cells biology

Keywords : TMEM176A/B - ROR γ t - Type 17 immunity - Dendritic cells - Antigen presentation - MHC II

Abstract : Our immune system provides protection and regulates the homeostasis of the organism. For this, it consists of an innate immune response and an adaptive response. Our team has identified TMEM176A and TMEM176B. These proteins are intracellular ion channels that are particularly expressed both in ROR γ t⁺ cells and in dendritic cells. The generation of a deficient mouse for these two genes allowed us to study their role. We have demonstrated that the absence of *Tmem176a* and *b* does not affect the generation of ROR γ t⁺ cells, neither their ability to secrete cytokines. The study of two models of colitis allowed us to confirm that *Tmem176a* and *b* seem to be

dispensable in these cells. However, the epigenetic study of deficient dendritic cells put in evidence a deregulation of the MHC class II presentation pathway. We have detected a decrease of the proliferation of CD4⁺ T. Using an innovative microscopy technique, we have observed a preferential localization of TMEM176A and B in the endo-lysosomal pathway and in particular in the MIIC compartment involved in the presentation of antigens by the MHC class II pathway. Thus, these results suggest that in dendritic cells, *Tmem176a* and *b* are involved in the presentation of antigens and activation of naïve CD4⁺ T cells.