



HAL
open science

Rôle du trafic intracellulaire dans la signalisation et la réponse lymphocytaire T

Jean-Marie Carpier

► **To cite this version:**

Jean-Marie Carpier. Rôle du trafic intracellulaire dans la signalisation et la réponse lymphocytaire T. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB242 . tel-02145784

HAL Id: tel-02145784

<https://theses.hal.science/tel-02145784>

Submitted on 3 Jun 2019

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

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

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Discipline : IMMUNOLOGIE

Par **Jean-Marie CARPIER**

Pour l'obtention du grade de Docteur

le mercredi 23 novembre 2016

Sujet : **RÔLE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DANS LA SIGNALISATION ET LA
RÉPONSE LYMPHOCYTAIRE T**

Thèse dirigée par le **Dr. Claire HIVROZ**

Présentée et soutenue publiquement devant le jury composé de :

Dr. Bernard Malissen	Rapporteur
Dr. Vincenzo Di Bartolo	Rapporteur
Dr. Arnaud Echard	Examineur
Dr. Clotilde Randriamampita	Examinatrice
Dr. Geneviève de Saint Basile	Examinatrice
Dr. Nathalie Sauvonnnet	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier tous les membres du jury pour le temps précieux qu'ils ont bien voulu accorder à la lecture de ce travail de thèse. Je remercie chaleureusement les Dr. Vincenzo Di Bartolo et Dr. Bernard Malissen pour avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je voudrais également remercier les Dr. Clotilde Randriamampita, Dr. Arnaud Echard, Dr. Nathalie Sauvonnet et Dr. Geneviève de Saint Basile qui ont accepté d'examiner les travaux réalisés au cours de cette thèse et dont les expertises, j'en suis persuadé, contribueront grandement à ce travail. Je tiens également à remercier très chaleureusement le Dr. Clotilde Théry, le Dr. Sebastian Amigorena, le Dr. Romain Roncagalli, et le Dr. Olivier Joffre pour avoir participé à mes comités de thèse. Leurs conseils et leurs critiques m'ont beaucoup aidé et ont aussi permis de me guider. Merci beaucoup notamment à Romain et Olivier pour s'être déplacés à l'occasion de ces comités.

Je souhaite vivement remercier la Ligue Nationale Contre le Cancer, la Fondation pour la Recherche Médicale et l'Institut Curie qui m'ont financé pendant ces quatre années et qui m'ont ainsi permis de réaliser ce travail.

Je remercie Thierry Galli et son équipe, en particulier Lydia Danglot et Agathe Verraes pour nous avoir fourni les souris VAMP7 KO et tous les réactifs nécessaires à l'étude du rôle de VAMP7 dans le transport de LAT à la synapse immunologique, mais aussi pour tous les conseils sur nos travaux d'une manière générale. Je remercie également très chaleureusement les équipes de Bruno Goud et de Ludger Johannes, et plus particulièrement Sabine Bardin et Massiullah Shafaq Zadah pour nous avoir fourni les souris Rab6, ainsi que tous les réactifs nécessaires à l'analyse du transport rétrograde de LAT vers le Golgi. Merci également pour tous vos conseils et votre point de vue critique sur le projet. Collaborer avec vous a été une vraie chance et un vrai plaisir !

Je remercie tous les membres de l'animalerie de l'Institut Curie pour le travail remarquable qu'ils mènent. Tout spécialement, je souhaite remercier Isabelle Grandjean, Céline Daviaud pour le suivi de nos colonies de souris et pour toutes les discussions qui m'ont beaucoup aidé à avancer dans mes croisements et à toujours optimiser nos colonies. Merci à Aude Estelle, Manon Chartier et Océane Perrocheau pour avoir géré au quotidien les cages de souris en animalerie centrale, et André Nennot, Olivier Lebhar, Armelle Halle, Pierric Parent et Julie Sempe pour les nombreuses importations de souris qu'ils ont

réalisées pour moi, le suivi des cages en animalerie de quarantaine, ainsi que l'aide précieuse fournie pour la préparation des souris aux irradiations. Je remercie également le staff des plateformes d'imagerie Pict-IBISA@Pasteur (Patricia Le Baccon & Mathieu Maurin) et Nikon (Lucie Sengmanivong, Vincent Fraisier, Ludovic Leconte, Perrine Gilloteaux) pour leur disponibilité, leurs conseils et surtout pour nous permettre d'accéder à un grand nombre de microscopes et de réaliser des images de qualité. Merci beaucoup à toi Mathieu pour les heures passées à m'apprendre l'analyse d'images !!

Je remercie vivement tous les membres de l'unité U932 avec lesquels j'ai eu plaisir à discuter et collaborer. Je remercie notamment les chefs d'équipe de l'unité pour leur disponibilité et leur investissement dans la vie de l'unité. Merci également à Patricia Virapin pour le passage de commandes, son travail nous facilite grandement la vie au quotidien.

Je souhaite remercier très chaleureusement les membres de mon équipe. Claire, je ne saurais te dire à quel point je suis fier et reconnaissant d'avoir pu travailler dans ton équipe. Ces cinq années ont été tracées de réussites pour l'équipe, mais aussi de moments très difficiles. Je voudrais t'exprimer tout le respect et l'admiration que j'ai pour le courage dont tu as fait preuve et fait encore preuve aujourd'hui, ainsi que pour la dévotion que tu as envers ton équipe. Nous avons une chance énorme de travailler à tes côtés. Je te remercie pour la générosité et le partage dont tu as fait preuve. J'ai pu apprendre énormément à tes côtés sur les plans technique et théorique, mais j'ai surtout appris à réfléchir, à élaborer, à proposer... à « faire de la science ». Merci pour tout ton soutien, merci pour tout !

Je souhaite remercier Paola Larghi avec qui j'ai passé ma première année dans l'équipe. Paola, I would like to thank you a lot for everything you taught me, for your trust even if I was just a M2 student, for all your kindness and patience. Thanks a lot!!

Je voudrais remercier Armelle Bohineust, ancienne doctorante de l'équipe, pour tous ses conseils et sa perpétuelle bonne humeur ! Merci pour l'accueil chaleureux que tu m'as fait dans l'équipe. Je remercie aussi Stéphanie Dogniaux, ingénieure dans l'équipe. Merci à toi pour toute ton aide technique à la préparation de toutes les constructions et des vecteurs lentiviraux ! Merci aussi pour ta gentillesse. Je remercie Andrés Zucchetti, Laurence Bataille et Michael Saitakis (« Coucou ...») pour leur aide et toutes les discussions que nous avons eues.

Je voudrais remercier tous les membres anciens et présents du Pavillon Pasteur pour l'atmosphère qui y règne. Je remercie tout particulièrement Cassandra Mamotte, Elodie Miéville (merci à toutes les deux pour toutes les tâches administratives que vous avez faites pour moi et dont je ne comprends pas toujours toutes les subtilités, mais surtout merci pour votre bonne humeur inébranlable), Olivier Barret, Ella Zueva, Joao Magalhaes (Gamelas, de son nom de joueur de foot) & Patrycja Kozik (... « but not the way you think »...), Olivier Joffre, Omar Vivar, Lorena Martin-Jaular, Eik Hoffman, Ulf Gerhmann, Thomas Hoyler, Andrés Alloatti, Andrés Zucchetti, Laurence Bataille, Luigia Pace, Lorenzo Tibaldi, Mercedes Tkach, Christelle Goudot, Derek Rookhuizen, Leonel Joannas, Stéphanie Dogniaux, Sophie Krumeich, Andy Tempez, Angélique Bobrie, Armelle Bohineust, Mélanie Durand, Joanna Kowal, Alizée Gouronnec, Marine Gros, Tsing-Lee Tang, Mathilde Mathieu... Merci à tous d'avoir apporté votre grain de folie et d'avoir entretenu l'ambiance si particulière de cet étage.

Je souhaiterais également écrire quelques mots pour certaines personnes avec qui j'ai tissé de véritables liens d'amitiés au fil du temps !

En particulier, merci à Mélanie. Merci pour tous nos fous rires, tes encouragements constants, mais aussi de m'avoir aidé à relativiser. Nous avons découvert ensemble que la thèse, c'est dur, et là on a mis nos mains, et on a dit « on n'y arrivera jamais, pffffiouu ». Bien sûr qu'on y arrivera, t'es la prochaine ! Aie confiance en toi, reste fidèle à toi-même et tout se passera comme sur des roulettes !

Joao... entre nos nuits au labo et tous nos craquages, qu'est-ce qu'on aura bien rigolé, hein ?! Merci pour tout ce que tu m'as appris, la science, et puis aussi le reste ;) ... Si je ressorts de ces 4 années de thèse meilleurs, plus confiant et disons... différent...moins naïf... c'est sûrement « grâce » à toi :D. Merci pour tout et s'il te plaît, fais-moi plaisir, FINIS TES FICHUES FIGURES !!!

Léo, mais quelle horreur, quelle horreur...! Merci mon ami, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée avec les souris, pour tout ce que tu m'as enseigné et pour tout ton soutien.

Merci à tous de m'avoir supporté, d'avoir été présents dans les moments de joie, mais aussi dans les coups durs !

Je tiens à remercier de tout mon cœur tous mes proches car je sais que vous aussi avez vécu cette thèse. En particulier, je remercie mes parents qui m'ont toujours soutenu et poussé pendant toutes ces années d'étude. Je remercie aussi Julie, merci de m'avoir nourri, soutenu, et remotivé dans les moments difficiles durant ces dix dernières années. Merci d'avoir été à mes côtés pendant ces années de thèse (merci, pour le fabuleux coloriage des schémas de ce manuscrit). Une nouvelle aventure nous attend de l'autre côté de l'Atlantique, et je suis tellement heureux de pouvoir la vivre avec toi !



Et...Merci à ta Stella pour avoir pointé le bout de son museau en cette fin de
thèse ...

TABLE DES MATIÈRES

ABBREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	8
AVANT-PROPOS	10
PARTIE 1 - INTRODUCTION	12
1.1. Du développement lymphocytaire T à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative	12
1.1.1. <u>Rappels sur la reconnaissance antigénique par le TCR</u>	12
1.1.2. <u>Développement lymphocytaire T$\alpha\beta$</u>	13
1.1.3. <u>L'activation et la réponse lymphocytaire T tardive</u>	15
1.1.3.1. Initiation de la réponse T (signaux 1 et 2)	15
1.1.3.2. Différenciation des effecteurs T CD4 ⁺ (signal 3)	18
1.2. Signalisation lymphocytaire T	20
1.2.1. <u>La signalisation lymphocytaire T proximale</u>	20
1.2.1.1. Le module de reconnaissance antigénique	20
1.2.1.2. Le module d'initiation de la signalisation	20
1.2.1.3. Le module d'amplification et de diversification du signal.....	22
1.2.2. <u>Les voies en aval de LAT induites par le TCR</u>	23
1.2.2.1. La voie calcique.....	23
1.2.2.2. La voie PI3Kinase.....	24
1.2.2.3. La voie Ras/MAPKinase.....	24
1.2.3. <u>L'adaptateur LAT : formation des signalosomes</u>	25
1.2.3.1. Structure de LAT, phosphorylation de résidues tyrosines & formation des signalosomes LAT	25
1.2.3.2. Autres modifications post-traductionnelles contribuant à la fonction de LAT	28
Palmytation de LAT	28
Ubiquitination de LAT.....	29
Phosphorylation de LAT sur résidu thréonine	29
1.2.3.3. Syndromes auto-immuns associés à LAT et interprétations	30
1.2.3.4. Les voies indépendantes de LAT proposées	32
La costimulation par CD28.....	32
De nouveaux adaptateurs	33
1.2.4. <u>La synapse immunologique : une plateforme qui coordonne la signalisation T dans l'espace et dans le temps</u>	34
1.2.4.1. Structure spatiale de la synapse immunologique	34
1.2.4.2. Formation des microclusters de signalisation ou la coordination de la signalisation dans le temps	36

1.2.4.3. Les microclusters LAT	39
1.2.4.4. Fonctions associées à la synapse immunologique	40
Microclusters & soutien du signal.....	40
Adaptation de la signalisation à l'antigène : le cSMAC balance entre soutien et terminaison du signal.....	41
Différenciation lymphocytaire T.....	81
La synapse une zone de sécrétion focalisée	42
1.2.4.5. Remaniements généraux du lymphocyte T en contact avec une CPAg	43
1.3. Le trafic intracellulaire et la signalisation lymphocytaire T	46
1.3.1. <u>Aperçu du fonctionnement des petites GTPases Rab</u>	46
1.3.1.1. Cycle d'une petite GTPase Rab	47
1.3.1.2. Protéines Rab et identité membranaire.....	48
1.3.1.3. Exemples d'effecteurs des protéines Rab	49
Les moteurs moléculaires	49
Les complexes d'arrimage et de fusion membranaires.....	50
1.3.2. <u>La polarisation du MTOC à la synapse immunologique</u>	101
1.3.2.1. Molécules impliquées dans la polarité du MTOC à la synapse immunologique	52
1.3.2.2. Déplacement du centrosome vers la synapse immunologique	53
1.3.2.3. Rôle du MTOC à la synapse immunologique.....	54
1.3.3. <u>Le trafic intracellulaire dans les lymphocytes T</u>	55
1.3.3.1. La sécrétion des granules cytotoxiques	5
Machinerie de maturation et de sécrétion des granules cytotoxiques	55
1.3.3.2. Le transport intracellulaire des molécules de signalisation proximales.....	58
Le trafic de p56 ^{Lck}	58
Le trafic intracellulaire du TCR.....	121
1.3.3.3. Le transport intracellulaire de LAT.....	66
1.3.4. <u>La protéine VAMP7 (TI-VAMP)</u>	68
1.3.5. <u>Les protéines Rab6</u>	72
1.3.5.1. Implications de Rab6 dans les voies de sécrétion (transport antérograde)	74
Rab6 et le bourgeonnement/fission de cargos exocytiques au sortir du TGN	74
Rab6 et le transport dépendant des microtubules	75
Rab6 et l'arrimage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique	76
1.3.5.2. Le transport rétrograde entre les endosomes et le TGN.....	77
Transports depuis les endosomes tardifs : exemple des récepteurs au mannose-6-phosphate	78
Transports depuis les endosomes de tri	79
Régulation de l'entrée dans l'appareil de Golgi.....	82
i. La reconnaissance et l'attachement des cargos rétrograde au TGN	82
ii. La fusion des cargos rétrogrades avec le TGN	84

1.4. Objectifs de la thèse : analyse du trafic intracellulaire de LAT et de son rôle dans l'activation lymphocytaire T..... 88

PARTIE 2 - MATÉRIEL & MÉTHODES..... 90

2.1. Cellules & Souris90

2.2. Anticorps et réactifs91

2.3. Production de lentivirus et infection des cellules Jurkat91

2.4. Plasmides et transfection92

2.5. Activation des cellules T Jurkat pour analyses phospho-blot.....92

2.6. Analyse par immunoblot.....93

2.7. Traitement des cellules T Jurkat par la monensine94

2.8. Microscopie électronique à transmission.....94

2.9. Immunofluorescence94

2.9.1. Préparation des lamelles et boîtes fluorodish.....94

2.9.2. Formation de conjugués entre les cellules Jurkat et B Raji.....95

2.9.3. Capture d'anticorps anti-HA95

2.9.4. Microscopie TIRF sur cellules fixées et vivantes.....95

2.9.5. Fixation des cellules96

2.9.6. Immunomarquages.....96

2.9.7. Montages des lamelles sur lames97

2.10. Microscopie et analyse d'images.....97

2.10.1. Microscopes98

2.10.2. Analyse du recrutement de LAT à la synapse immune formée entre des cellules T Jurkat et des cellules Raji, et création de « cellules moyennes »98

2.10.3. Analyse de LAT, phospho-LAT et ZAP70 à la synapse immunologique par microscopie TIRF99

2.10.4. Analyse des aires des marquages de LAT et de l'appareil de Golgi sur des images confocales99

2.11. Mesures de la sécrétion et production d'interleukine-2 dans les cellules T Jurkat. 100

2.12. Réaction Lymphocytaire Mixte (MLR) 101

2.13. Génération de chimères hématopoïétiques et immunisations 101

2.13.1. Reconstitutions..... 101

2.13.2. Immunisations et restimulation des cellules 101

2.13.3. Modèle de colite induits 103

2.14. Cytométrie en flux 103

2.15. Analyses statistiques.....	104
PARTIE 3 - RESULTATS.....	105
3.1. VAMP7 contrôle l'activation des lymphocytes T par la régulation du recrutement et de la phosphorylation de la forme vésiculaire de LAT aux sites d'activation du TCR.....	105
3.1.1. <u>VAMP7 contrôle le recrutement de LAT aux sites d'activation du TCR</u>	105
3.1.2. <u>VAMP7 et LAT sont co-transportées à la synapse immunologique</u>	109
3.1.3. <u>VAMP7 contrôle la phosphorylation de LAT induite par le TCR</u>	110
3.1.4. <u>La protéine VARP associée à VAMP7 est impliquée dans le transport de LAT à la synapse immunologique</u>	110
3.1.5. <u>VAMP7 contrôle la formation du signalosome LAT</u>	111
3.1.6. <u>VAMP7 contrôle l'activation induite par le TCR des lymphocytes T</u>	112
3.1.7. <u>Conclusions</u>	113
3.1.8. <u>Contributions</u>	114
3.2. Le recrutement de LAT à la synapse immune et l'activation lymphocytaire T requiert un transport rétrograde dépendant de Rab6.....	116
3.2.1. <u>La fraction de LAT à la membrane plasmique est internalisée et recycle à la synapse immunologique</u>	116
3.2.2. <u>Le recyclage de LAT à la synapse immunologique est indépendant de Rab11</u> .118	118
3.2.3. <u>LAT transite par le TGN</u>	119
3.2.4. <u>Rab6 contrôle le recrutement de LAT à la synapse immunologique</u>	120
3.2.5. <u>LAT emprunte une voie de transport rétrograde depuis les endosomes vers le TGN</u>	122
3.2.6. <u>La machinerie de transport rétrograde contrôle la réponse lymphocytaire T</u>	123
3.2.7. <u>Le recrutement de LAT et l'activation lymphocytaire T sont déficients chez la souris en absence de Rab6</u>	123
3.2.8. <u>La réponse lymphocytaire T est abrogée en absence de Rab6</u>	126
3.2.9. <u>Conclusions</u>	129
3.2.10. <u>Contributions</u>	130
3.3. IFT20 contrôle l'activation lymphocytaire T.....	261
3.3.1. <u>IFT20 contrôle la signalisation induite par le TCR</u>	261
3.3.2. <u>Le recrutement de LAT aux sites d'activation du TCR est affecté en absence de IFT20</u>	132
3.3.3. <u>IFT20 contrôle l'activation tardive ex vivo des lymphocytes T</u>	133
3.3.4. <u>IFT20 contrôle l'activation in vivo des lymphocytes T</u>	134
3.3.5. <u>Conclusions</u>	135

3.3.6. <u>Contributions</u>	135
PARTIE 4 – DISCUSSION	137
4.1. Choix et critiques des méthodes ou approches employées	138
4.1.1. <u>Les modèles biologiques employés</u>	138
4.1.1.1. L'approche par perte de fonction	138
L'approche lentivirale d'extinction de l'expression de candidats au transport de LAT	139
Les contrôles spécifiques à nos études	139
4.1.1.2. Les modèles cellulaires	140
4.1.1.3. Modèle de souris KO totales, KO non conditionnelles inductibles et KO conditionnelles non inductibles	142
Choix et comparaison des modèles	142
Analyse des compartiments immunitaires	145
4.1.2. <u>Les modèles d'activation employés</u>	146
4.1.2.1. L'activation avec des anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28	146
Anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 solubles	146
Anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 fixés	147
4.1.2.2. L'activation avec des cellules présentatrices d'antigène	148
4.1.2.3. Explications proposées pour les différences de résultats entre les modèles antigéniques et non antigéniques	150
4.1.3. <u>L'imagerie photonique</u>	151
4.1.3.1. Les analyses de colocalisation	151
4.1.3.2. La quantification d'images	152
4.2. Critiques et perspectives sur les résultats obtenus	154
4.2.1. <u>La voie de transport exocytique de LAT vers la synapse immunologique ou le rôle de VAMP7 dans le transport de LAT</u>	154
4.2.1.1. Rappel succinct des résultats	154
4.2.1.2. Implication de VAMP7 dans la signalisation précoce ou pourquoi une signalisation existe lorsque le signalosome est altéré ?	155
Signalisation indépendante de LAT en absence de VAMP7 ?	155
Contribution de la fraction de LAT à la membrane plasmique ?	156
4.2.1.3. Modèles proposés pour le transport de LAT à la synapse immunologique	158
Rôle de VAMP7 dans l'arrimage/fusion des vésicules LAT aux sites d'activation du TCR	159
Autres rôles de VAMP7 envisageables dans le trafic de LAT ?	159
i. La sécrétion de LAT depuis des compartiments tardifs à la synapse	160
ii. La sécrétion depuis les endosomes vers la synapse immune	161
iii. La sécrétion de LAT depuis le TGN vers la synapse immune	161
iv. L'emploi de la machinerie de cillio-génèse pour le transport de LAT ?	162
4.2.2. <u>Rab6 et la voie rétrograde de LAT</u>	164
4.2.2.1. Rappel succinct des résultats	164

4.2.2.2. Critiques/soutien/perspectives sur les interprétations faites concernant le transport rétrograde de LAT au TGN.....	165
4.2.2.3. Pourquoi un transport rétrograde de LAT ?.....	169
Le transport hautement polarisé de LAT vers la synapse immunologique	169
Atteindre la machinerie de sécrétion adéquate : VAMP7.....	170
La séparation des voies de transport des molécules de signalisation	171
L'appareil de Golgi comme « point de contrôle » des formes endocytées de LAT ?.....	172
Un transport rétrograde des signalosomes LAT vers le Golgi ?	173
4.3. Perspectives	174
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	176
ANNEXES	188
ANNEXE 1 : Autres contributions scientifiques	188
ANNEXE 2 : Scripts utilisés pour les analyses d'images	189
Analyse du recrutement de LAT à la synapse immune formée entre des cellules T Jurkat et des cellules Raji et création de « cellules moyennes »	189
Analyse de LAT, phospho-LAT et ZAP70 à la synapse immunologique par microscopie TIRF.....	192
Analyse des aires des marquages de LAT et de l'appareil de Golgi sur des images confocales.	193
Analyse du « clustering » du marquage LAMP1 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse.....	195

ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AP-1,2,3 : Activator protein-1,2,3
aPKC : atypic PKC
APP : Amyloid Precursor Protein
ARN = RNA : Acide ribonucléique
ARNi : ARN interférent
ARNm : ARN messenger
Arp2/3 : Actin-related protein 2/3
BFA : Brefeldine-A
BG : Benzylguanine
BICDR : Bicaudal-D-related protein
CALM : Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein
CD : Cluster of differentiation
CD-MPR : Cation-dependent mannose phosphate receptor
CD2AP : CD2-Associated Protein
Cdc42 : Cell division cycle 42
CFA : Adjuvant Complet de Freund
CI-MPR : Cation-independant mannose phosphate receptor
cKO : conditional KO
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COP-I : Coat protein complex-I
CPAg : Cellule présentatrice d'Antigène
CRAC : Calcium release activated channel
Crb : Crumbs
CSK : C-terminal Src kinase
cSMAC : central SMAC
cTEC : cortical TEC
CTL : Lymphocyte T cytotoxique
DAG : Diacylglycerol
DAMP : Damage-associated molecular patterns
DC : Dendritic Cell
DN : Double négatif
DP : Double positif
dSMAC : distal SMAC
EB1 : End-Binding protein 1
EE : Early endosome, endosome de tri
EGF : Epidermal Growth Factor
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
FIP : Rab11-family interacting proteins
FRET/FLIM : Fluorescence Resonance Energy Transfer/Fluorescence Lifetime
GAP : GTPase Activating Protein
GARP : Golgi associated retrograde protein complex
GDI : GTPase dissociation factor
GDP : Guanosine diphosphate
GEF : Guanine exchange factor
GGT : Geranyl-Geranyl Transferase
GTP : Guanosine TriPhosphate
HA : Hémagglutinine
HLH : Lymphohistiocytoses hémophagocytiques
HSA : Human serum albumin
ICAM-1 : Inter-cellular adhesion molecule-1
IFN : Interferon
IFT : Intraflagellar transport
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IP₃ : Inositol TriPhosphate
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KO : Knock-Out
LAT : Linker for T cell Activation
LB : Lymphocyte B = Cellule B
Lck = p56^{Lck} : Leukocyte C-terminal Src kinase
LE : Late endosome, endosome tardif
LFA-1 : Lymphocyte function associated antigen-1
LPS : Lipopolysaccharides

LT : Lymphocyte T
MAPK = MAPKinase
MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence
MLR : Réaction Lymphocytaire Mixte
MPR : Mannose Phosphate Receptor
mTEC : medullary TEC
mTeNT : mutated TeNT
MTOC : Microtubule-Organizing Center
MVB : Multivesicular bodies
NK : Natural Killer
nPKC : novel PKC
NPY : neuropeptide Y
OST : One Streptag
OVA : Ovalbumine
PALM : PhotoActivated Localization microscopy
PAMP : Pathogen-associated molecular patterns
Par : Partitioning defective polarity complex
pCMH : peptide-CMH
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC : Protéine Kinase C
PLC : Phospholipase C
PMA : Phosphol myristate acétate
pSMAC : peripheral SMAC
RE : Recycling endosome
REP : Rab escort protein protein
RNA = ARN : Acide ribonucléique
RNAi = ARNi : ARN interférent
ROI : Region of interest
SEB : Staphylococcal enterotoxin B
SEE : Staphylococcal enterotoxin E
shC : sh Contrôle
shRNA : small hairpin RNA
SLP76 : SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa
SMAC : Supra Molecular Activation Clusters
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNX : sorting-nexin
SOCE : Store-operated calcium entry
Sos : Son of sevenless
SP : Simple positif
STxB : Fragment B de la toxine Shiga
t-SNARE : target-SNARE
TCR : T-Cell Receptor
TEC : Thymic epithelium cell
TeNT : Tetanus neurotoxin
TfR : Transferin receptor
TGN : Trans Golgi Network
Th : Thelper = T auxiliaire
TI-VAMP = VAMP7 : Tetanus neurotoxin Insensitive-VAMP
TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence
TLR : Toll Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
Treg : Lymphocyte T régulateur
TSST1 : Toxic shock syndrome toxin 1
Unc119 : Uncoordinated119
v-SNARE : vesicular-SNARE
VAMP : Vesicle Associated Membrane Protein
VARP : Vps9 domain and Ankyrin repeats containing protein
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1
VFT : Vps fifty-three
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vps : Vacuola protein sorting
VSV-g : Vesicular stomatitis virus-glycoprotein
WASH : WASP and Scar homologue
WASp : Wiskott Aldrich syndrome protein
WT : Wild-type
ZAP70 : Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa

LISTE DES FIGURES ET VIDÉOS

INTRODUCTION

- Figure 1.1.1.** Initiation de la réponse immunitaire adaptative.
- Figure 1.1.2.** Reconnaissance antigénique via les molécules des CMH de classe-I ou de classe-II.
- Figure 1.1.3.** Etapes de différenciation thymique.
- Figure 1.1.4.** Différenciation thymique des lymphocytes T : focus sur les stades DN.
- Figure 1.1.5.** Polarisation des lymphocytes T CD4⁺ vers différentes sous-populations de T « helpers ».
-
- Figure 1.2.1.** Vue classique de la signalisation lymphocytaire T.
- Figure 1.2.2.** Structure de l'adaptateur LAT.
- Figure 1.2.3.** Structure de SLP-76.
- Figure 1.2.4.** Signalosomes LAT impliqués dans la régulation positive et négative de la signalisation induite par le TCR.
- Figure 1.2.5.** Interactomes de ZAP-70, SLP-76 et LAT.
- Figure 1.2.6.** Organisation de la synapse dite « mature » décrite par A.Kupfer et M. Dustin.
- Vidéo 1.1.** Modèle d'exclusion de CD45 régulant la phosphorylation du TCR (proposé par Chang et *al.*).
- Figure 1.2.7.** Etapes successives de formation de la synapse immunologique avec une CPAg ou bien une bicouche lipidique.
- Vidéo 1.2.** Flux d'actine centripète à la synapse immunologique.
- Figure 1.2.8.** Illustration de la fonction de Sos dans l'oligomérisation de LAT.
- Figure 1.2.9.** Modèle proposé par le groupe de L.E. Samelson sur la fonction de Sos dans l'oligomérisation de LAT lors de l'engagement du TCR.
- Figure 1.2.10.** Remaniements intracellulaires d'un lymphocyte T CD4⁺ formant une synapse avec une CPAg.
- Figure 1.2.11.** Images par microscopie électronique à transmission d'un lymphocyte T CD4⁺ établissant une synapse.
-
- Figure 1.3.1.** Cycle d'activation des petites GTPases Rab.
- Figure 1.3.2.** Les petites GTPases Rab sont localisées au niveau de différents compartiments intracellulaires où elles jouent diverses fonctions : exemples du trafic intracellulaire endocytaire.
- Figure 1.3.3.** Les petites GTPases Rab jouent de multiples fonctions entre le compartiment donneur et le compartiment accepteur.
- Figure 1.3.4.** Les protéines SNAREs et la fusion membranaire.
- Figure 1.3.5.** Mise en place d'une synapse cytolytique par des CTLs conduisant à la sécrétion des granules cytotoxiques.
- Figure 1.3.6.** Modèle de maturation des granules cytolytiques avant leur sécrétion à la synapse formée entre une CTL et une cellule cible.
- Figure 1.3.7.** Modèle de transport des granules cytotoxiques *via* le cytosquelette de microtubules.
- Figure 1.3.8.** Modèle de transport de p56^{Lck} depuis les endosomes de recyclage Rab11⁺.
- Figure 1.3.9.** Modèle de « downmodulation » du TCR induite par l'activation et dépendante de Rab35.
- Vidéo 1.3.** Recrutement de la fraction intracellulaire de LAT à la synapse immunologique.
- Figure 1.3.10.** Modèle du transport de cargos VAMP7⁺ depuis le Golgi vers la périphérie neuronale.
- Figure 1.3.11.** Fonctions de Rab6 dans le trafic intracellulaire.
- Figure 1.3.12.** Rôle des moteurs moléculaires myosine-II et KIF5B dans l'export des vésicules exocytiques depuis le TGN.
- Figure 1.3.13.** Fonction de fusion de cargos exocytiques impliquant l'effecteur de Rab6, ELKS (Rab6IP2).
- Figure 1.3.14.** Voies de transport rétrograde depuis les différents compartiments endocytiques vers le TGN.
- Figure 1.3.15.** Modèle d'association du rétromère.
- Figure 1.3.16.** Exemple d'un modèle d'arrimage des vésicules rétrogrades au TGN médié par la golgine-97.
-
- Figure 1.4.1.** Objectifs de la thèse.

RÉSULTATS

- Figure 3.1.1.** VAMP7 contrôle le recrutement de LAT aux sites d'activation du TCR dans les lymphocytes T humains.
- Figure 3.1.2.** Caractérisation de la construction et des compartiments immunitaires des souris VAMP7 KO.

- Figure 3.1.3.** VAMP7 contrôle le recrutement de LAT à la synapse immune dans les lymphocytes T CD4⁺ de souris.
- Figure 3.1.4.** Le transport de LAT vers la synapse immunologique ne dépend pas des SNAREs vésiculaires sensibles à la neurotoxine tétanique.
- Figure 3.1.5.** VAMP7 et LAT sont co-transportées à la synapse immunologique.
- Vidéo 3.1.** Trafic de LAT et VAMP7 à la synapse immunologique.
- Figure 3.1.6.** VAMP7 contrôle la phosphorylation de LAT après l'induction du TCR.
- Figure 3.1.7.** L'interaction VARP-Rab21 contrôle la phosphorylation de LAT à la synapse immunologique.
- Figure 3.1.8.** VAMP7 contrôle la formation des signalosomes LAT.
- Figure 3.1.9.** VAMP7 contrôle la réponse lymphocytaire T induite par le TCR.
- Figure 3.2.1.** La fraction intracellulaire de LAT est contenue dans des compartiments endocytiques et recycle à la synapse immunologique.
- Figure 3.2.2.** Le recyclage de LAT à la synapse immunologique n'est pas dépendant de Rab11.
- Figure 3.2.3.** La fraction intracellulaire de LAT transite dynamiquement par l'appareil de Golgi/TGN.
- Figure 3.2.4.** Rab6 est impliquée dans le transport de LAT à la synapse immunologique.
- Vidéo 3.2.** Trafic de LAT et Rab6 à la synapse immunologique.
- Figure 3.2.5.** Expression de marqueurs de surface et de LAT dans les cellules éteintes pour Rab6.
- Figure 3.2.6.** La syntaxine-16 contrôle le recrutement de LAT à la synapse immunologique
- Figure 3.2.7.** La voie de transport rétrograde régulée par Rab6 et syntaxin-16 est requise pour la production d'IL-2 par les lymphocytes T.
- Figure 3.2.8.** Génération des souris Rab6 cKO.
- Figure 3.2.9.** Caractérisation des compartiments immunitaires des souris Rab6 cKO.
- Figure 3.2.10.** Le recrutement de LAT à la synapse immune est déficient dans les lymphocytes T CD4⁺ Rab6 cKO.
- Figure 3.2.11.** L'activation tardive des lymphocytes T CD4⁺ de souris n'est pas impactée en absence de Rab6 dans un système antigène non spécifique.
- Figure 3.2.12.** L'activation tardive des lymphocytes T CD4⁺ de souris est déficiente en absence de Rab6 dans un contexte allogénique.
- Figure 3.2.13.** Le compartiment effecteur/mémoire est réduit en absence de Rab6.
- Figure 3.2.14.** La réponse lymphocytaire T est abrogée en absence de Rab6.
- Figure 3.2.15.** Réponse *in vivo* IL-2, IL-5 et IL-4 en absence de Rab6.
- Figure 3.3.1.** La signalisation TCR est déficiente dans les souris IFT20.
- Figure 3.3.2.** IFT20 contrôle la phosphorylation de ZAP70 et le recrutement de LAT à la synapse immunologique.
- Figure 3.3.3.** L'activation lymphocytaire T CD4⁺ est déficiente *ex vivo* est déficiente en absence d'IFT20.
- Figure 3.3.4.** Défaut *in vivo* de la réponse lymphocytaire T CD4⁺ en absence d'IFT20.

DISCUSSION

- Figure 4.2.1.** Modèles pour la fonction de VAMP7 dans l'arrimage/fusion des cargos LAT aux sites d'activation du TCR.
- Figure 4.2.2.** Modèles pour la fonction de VAMP7 dans le trafic intracellulaire de LAT vers la synapse immunologique.
- Figure 4.2.3.** Hypothèse de travail - LAT est internalisé dans des endosomes précoces/de recyclage et est transporté à la synapse immunologique *via* une voie de transport rétrograde vers le TGN dépendante de Rab6 et de la syntaxine-16.
- Figure 4.2.4.** *Expérience de « trapping » de cargo rétrograde : application à l'analyse du transport rétrograde de LAT.*

AVANT-PROPOS

L'immunité chez les organismes mammifères est déterminante dans la lutte contre les pathogènes extérieurs (bactéries, virus, parasites), certaines toxines ou contre les cellules tumorales. Un grand nombre d'effecteurs cellulaires sont mis en jeu afin de lutter contre ces éléments pathogènes. La spécialisation de ces effecteurs de l'immunité dans l'induction d'une réponse robuste à différents dangers par des processus cellulaires très variés (migration, phagocytose, dégradation intracellulaire, sécrétion de facteurs solubles pour la communication intercellulaire ou la lyse cellulaire) en font des outils très polyvalents de l'immunité. La compréhension des mécanismes sub-cellulaires sous-jacents à ces fonctions ainsi que leur régulation constituent un point central de l'étude du système immunitaire. Mon travail de thèse a porté sur le questionnement relatif aux mécanismes moléculaires régulant l'activation des lymphocytes T. Ces cellules de l'immunité sont capables de reconnaître des antigènes apprêtés par différentes cellules présentatrices. Cette reconnaissance est médiée par le récepteur T à l'antigène (TCR) qui induit une signalisation associée au trafic d'un certain nombre d'effecteurs moléculaires. Mon travail de thèse a porté sur l'analyse de deux aspects qui sont : *i.* l'immunité médiée par la signalisation lymphocytaire T et *ii.* sa régulation par le trafic intracellulaire dans les lymphocytes T. Cela fait très certainement l'originalité de ce travail, mais aussi sa difficulté du fait des nombreux effecteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu dans ces deux domaines d'étude.

Ayant débuté mon cursus de master sur les questions liées au cancer, j'avais été particulièrement intéressé par les voies de transduction du signal. Cependant, à mon arrivée dans l'équipe de Claire Hivroz en 2011, j'avais encore une vision « naïve » d'une cascade de signalisations très linéaire, mise en place à la membrane plasmique. J'ai particulièrement été intéressé par l'idée que la signalisation et la réponse cellulaire puissent être régulées par le transport intracellulaire de récepteurs et autres molécules de signalisation et que ce trafic puisse influencer la réponse cellulaire et la réponse de tout un système en fin de course.

Au cours de ma thèse, j'ai ainsi étudié le trafic intracellulaire d'une molécule importante pour la transduction du signal au sein des lymphocytes T et la réponse immunitaire adaptative : l'adaptateur LAT (« Linker for T cell Activation »). Je commencerai donc par une introduction rappelant succinctement le développement des lymphocytes T ainsi que leur rôle dans la réponse immunitaire (**Partie 1.1**). Je m'attacherai à comprendre l'implication de LAT dans la signalisation lymphocytaire T (**Partie 1.2**). La signalisation lymphocytaire T est classiquement décrite à la synapse immunologique qui est une zone de la cellule très active au cours de l'activation T et que je décrirai dans la **partie 1.2.4**). Enfin, le trafic intracellulaire régule plusieurs voies de transport dans les lymphocytes T impliquées dans la sécrétion mais aussi dans la signalisation. Je donnerai quelques exemples de ces voies de transport régulées (**Partie 1.3.3**). Les mécanismes du trafic intracellulaire mettent en jeu différents acteurs moléculaires. Mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle de trois familles de molécules dans le transport de LAT et la réponse T : les protéines de fusion membranaire v-SNAREs (VAMP7), les petites GTPases Rab (Rab6), et les protéines de transport intraflagellaire (IFT20). L'analyse du rôle de VAMP7 et Rab6 dans l'activation lymphocytaire a focalisé la majorité de mon attention au cours de ma thèse et j'en présenterai donc les fonctions principales dans le trafic intracellulaire (**Partie 1.3.4-5**).

Dans l'objectif de comprendre le rôle de VAMP7, Rab6 et IFT20, des approches par perte de fonction ont été choisies chez l'homme (RNA interférence), ou chez la souris (KO total ou conditionnels). Les résultats obtenus *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo* seront présentés dans la section des résultats.

Enfin, la méthodologie employée dans ce travail de thèse ainsi que les résultats obtenus seront discutés à la lumière de la recherche actuelle dans le domaine dans une dernière partie.

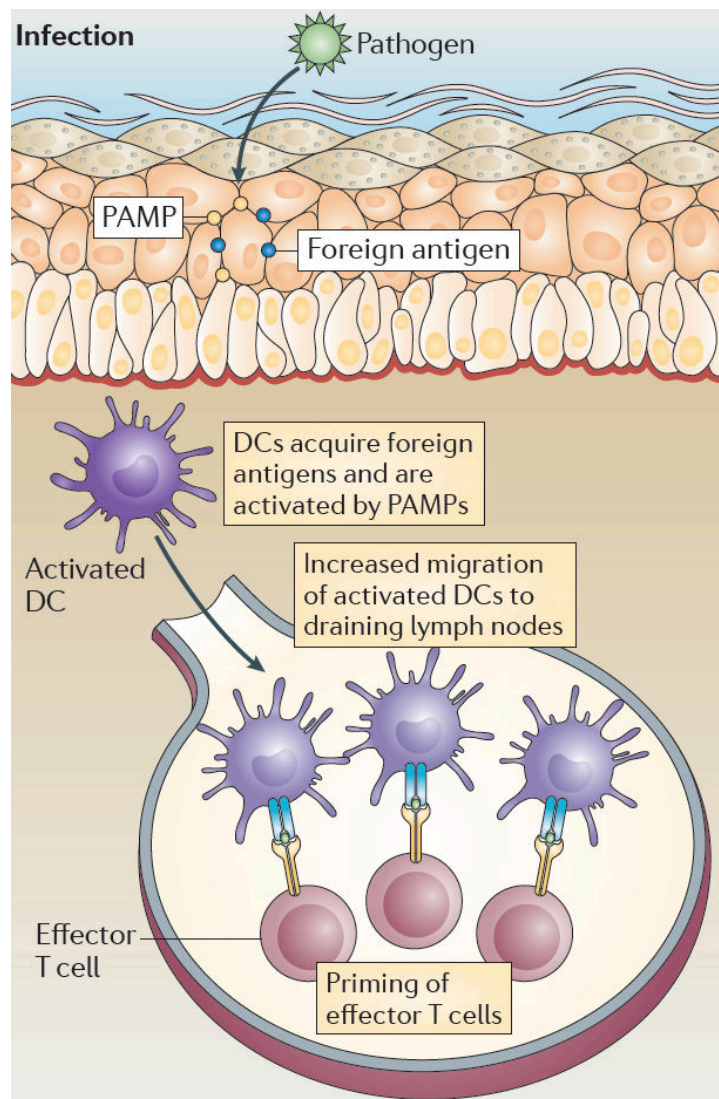


Figure 1.1.1. Initiation de la réponse immunitaire adaptative (exemple dans un ganglion lymphatique)

Dans le tissu, les cellules dendritiques (DCs) immatures ont une activité de phagocytose importante et internalisent les antigènes pour les dégrader, et les peptides antigéniques générés sont apprêtés sur les molécules du CMH de classe II (présentation classique) ou les molécules du CMH de classe I (présentation croisée). De manière concomitante, la détection de motifs associés aux pathogènes (PAMPs) ou à des signaux de danger (DAMPs) conduit à l'augmentation de l'expression des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation (CD80/86) à la surface des DCs, et à leur migration *via* les vaisseaux lymphatiques. Dans le ganglion lymphatique drainant, la reconnaissance par un lymphocyte T d'un peptide antigénique induit l'activation de ce dernier qui acquière par la suite des propriétés effectrices (Summers deLuca and Gommerman, 2012).

PARTIE 1 - INTRODUCTION

1.1. Du développement lymphocytaire T à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative

1.1.1. Rappels sur la reconnaissance antigénique par le TCR

Les travaux de Bruce A. Beutler, Jules A. Hoffman et Ralph M. Steinman (prix Nobel de Physiologie et Médecine, 2011) ont permis de mettre en évidence les liens existant entre les immunités innées et adaptatives. En effet, les cellules dendritiques (DCs) qui sont les cellules présentatrices d'antigène (CPAg) professionnelles, sont d'origine myéloïdes et expriment différents récepteurs aux motifs moléculaires (Pattern Recognition motifs Receptor, PRR) comme les récepteurs TLR (Toll-Like Receptor) ou NLR (NOD-Like Receptor). En particulier, les cellules dendritiques immatures ont une capacité phagocytaire importante et peuvent ainsi internaliser les antigènes présents dans le microenvironnement (**Fig.1.1.1**). Par ailleurs, leurs récepteurs innés leur permettent de détecter les motifs de pathogènes et de dangers. Ces propriétés en font de véritables sentinelles à la périphérie de l'organisme. La mise en jeu des récepteurs innés conduit à la maturation des DCs dont la capacité phagocytaire décroît tandis que s'accroissent les aptitudes de migration dans les vaisseaux lymphatiques, de dégradation des antigènes et de présentation des peptides antigéniques sur les produits de classe-II (présentation classique) et de classe-I (présentation croisée) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Les travaux de l'australien Peter Doherty et du suisse Rolf Zinkernagel (prix Nobel de Physiologie et Médecine, 1996) ont permis de mettre en évidence dans le contexte d'une infection virale que la reconnaissance antigénique est restreinte par le CMH de l'individu (travaux publiés en 1974). Par la suite, le clonage et la caractérisation du récepteur T à l'antigène a très largement contribué à la

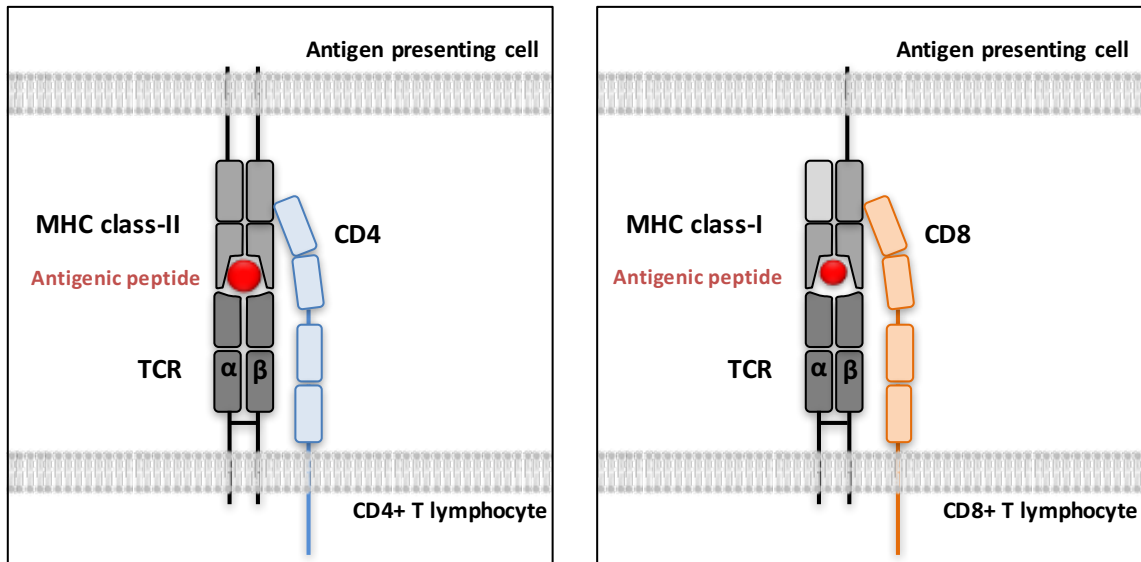


Figure 1.1.2. Reconnaissance antigénique via les molécules des CMH de classe-I ou de classe-II.

Les CPAg présentent les peptides antigéniques *via* les CMH de classe-I reconnues par le TCR $\alpha\beta$ des lymphocytes T CD4⁺ et les CMH de classe-II reconnues par le TCR $\alpha\beta$ des lymphocytes T CD8⁺.

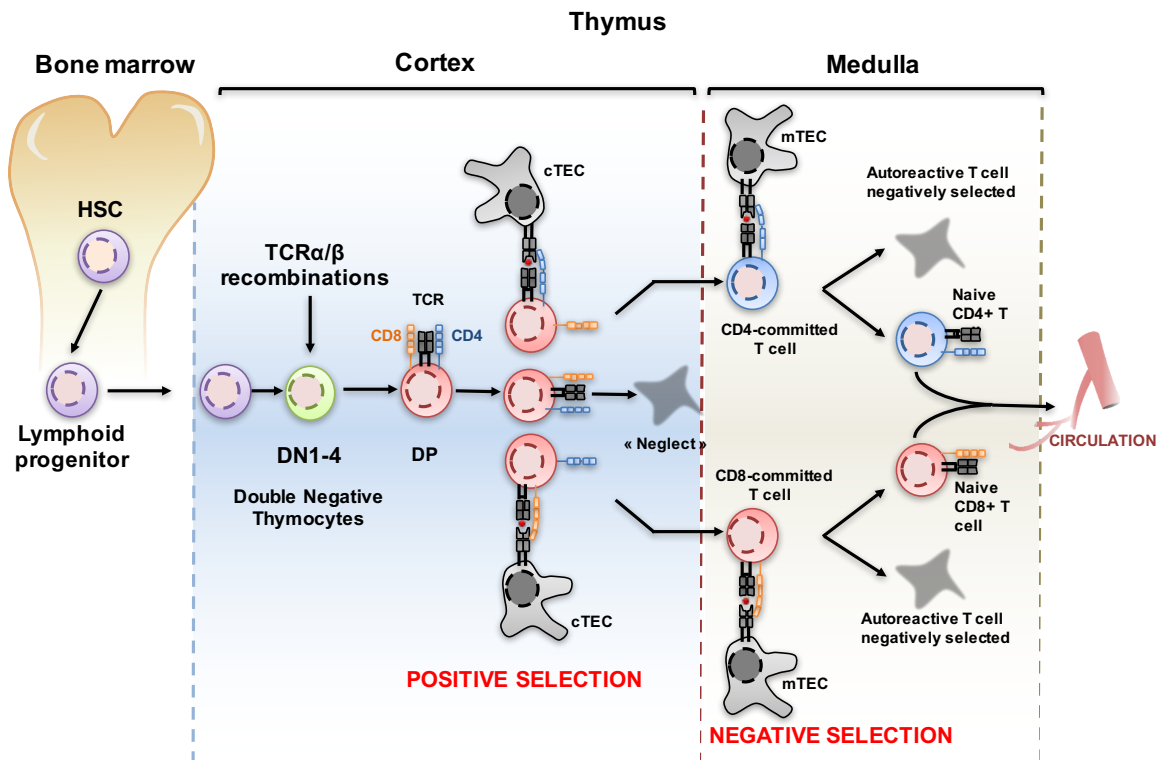


Figure 1.1.3. Etapes de différenciation thymique.

Les progéniteurs lymphoïdes provenant de la moelle osseuse migrent dans le cortex thymique et entrent alors dans les stades de différenciation précoce des lymphocytes T DN n'exprimant pas CD4, CD8 ou encore les chaînes α et β du TCR. Entre les stades DN2 et DN4, le locus de la chaîne β du TCR, puis celui de la chaîne α , sont recombinés afin d'exprimer une combinaison TCR $\alpha\beta$ unique. Au stade DP, CD4 et CD8 sont exprimés et les cellules sont sélectionnées sur la capacité du TCR $\alpha\beta$ réarrangé à reconnaître à la surface des cTECs le CMH de classe-I et le CMH de classe-II présentant les peptides du soi. L'absence de signalisation induite par cette reconnaissance induit la mort par négligence (« neglect »), tandis que les autres cellules poursuivent leur différenciation dans la zone médullaire du thymus où les cellules mTECs ont la capacité d'exprimer de manière ectopique les antigènes du soi. La sélection négative permet d'éliminer les clones présentant une forte affinité pour le soi. Les progéniteurs qui ont une affinité intermédiaire se différencient en lymphocytes T régulateurs (Treg). Le reste des cellules qui présente une faible affinité pour les peptides du soi présentés par les CMH de classe-I ou de classe-II, se différencie en lymphocytes T CD4⁺ et en lymphocytes T CD8⁺ qui circulent dans la périphérie de l'organisme.

compréhension de cette reconnaissance par le lymphocyte T (Hedrick et al., 1984; Weiss, 2005; Yanagi et al., 1984).

Chaque lymphocyte T exprime en effet un récepteur T à l'antigène (TCR) unique composé de deux chaînes transmembranaires α et β ou bien γ et δ . L'association de ces chaînes conduit à la formation d'une région unique de reconnaissance de peptides antigéniques. La reconnaissance par les TCR $\alpha\beta$ des lymphocytes T CD4⁺ est restreinte au CMH de classe-II exprimé par des CPAg capables de capturer l'antigène (cellules dendritiques, lymphocytes B et macrophages). Les TCR $\alpha\beta$ des lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent un peptide présenté par le CMH de classe-I qui est porté par toutes les cellules de l'organisme (**Fig.1.1.2**).

1.1.2. Développement lymphocytaire T $\alpha\beta$

Le nombre et la proportion de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ en périphérie de l'organisme constituent des paramètres importants dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative efficace. La fonction du thymus est ainsi d'assurer le développement central des T CD4⁺ et CD8⁺ dans des quantités et proportions adéquates. Par ailleurs, une seconde fonction du développement thymique est de garantir la production de lymphocytes T exprimant de manière clonale un TCR capable d'interagir avec le CMH de classe-I ou avec le CMH de classe-II.

Afin d'assurer ces fonctions, plusieurs étapes se succèdent dans différentes régions du thymus (**Fig.1.1.3**). Les progéniteurs lymphoïdes provenant de la moelle osseuse migrent dans le cortex thymique où elles perdent leur potentiel de différenciation vers les lignées de lymphocytes B, les cellules NK, les cellules dendritiques. Elles entrent alors dans les stades de différenciation précoces des lymphocytes T sans exprimer les co-récepteurs CD4 et CD8 ou les chaînes α et β du TCR (stades doubles négatifs, DN). Cette étape DN est subdivisée en 4 stades caractérisés entre autres par l'expression des marqueurs CD25 et CD44 (DN1, CD25⁻

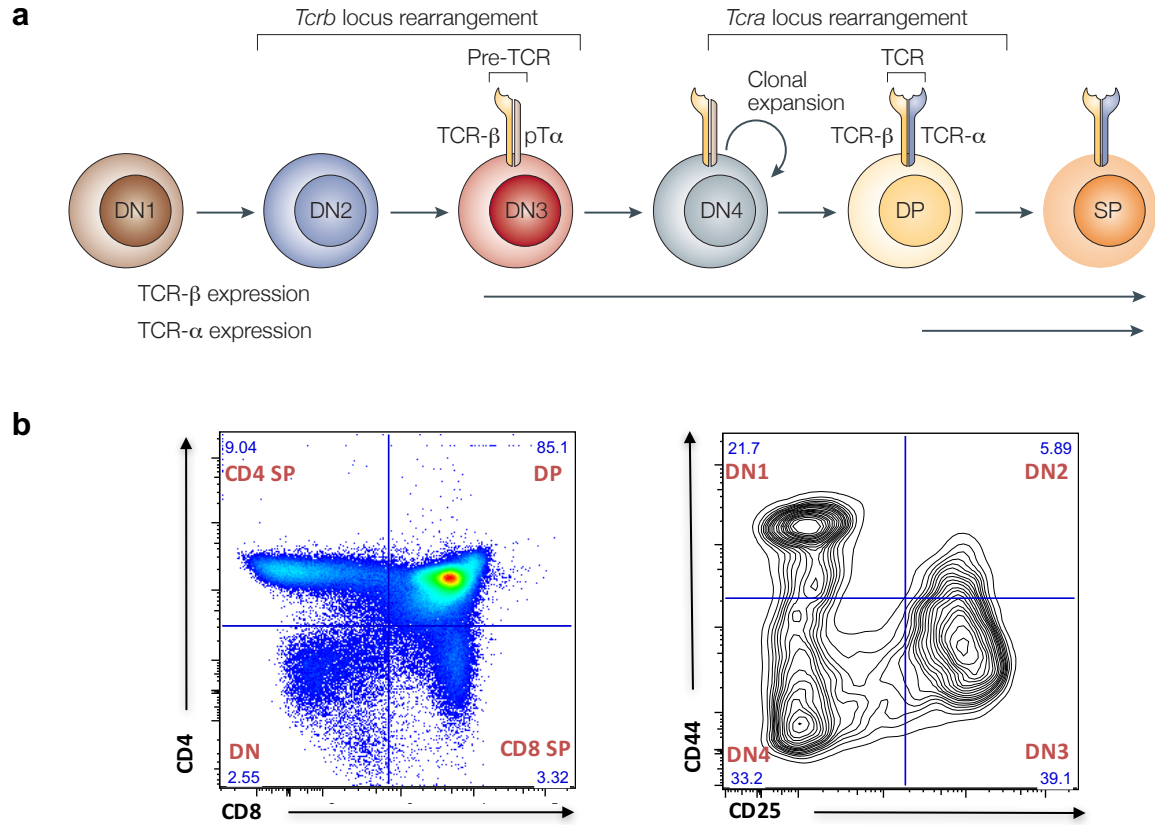


Figure 1.1.4. Différenciation thymique des lymphocytes T : focus sur les stades DN.

(a) Les stades DN1 et DN2 sont caractérisés par une prolifération importante des cellules. A partir du stade DN2, le locus de la chaîne β du TCR est recombéné et forme avec la chaîne pré-T α , un pré-TCR au stade DN3 où la prolifération diminue. A la suite de la β -sélection, les cellules se remettent à proliférer (stade DN4) et le locus de la chaîne α du TCR est à son tour recombéné et exprimé à partir du stade DP. (b) A gauche, analyse par cytométrie en flux du thymus montrant les stades DN (CD4⁺CD8⁻), DP (CD4⁺CD8⁺), CD4SP (CD4⁺CD8⁻), CD8SP (CD4⁻CD8⁺). A droite, analyse par cytométrie en flux de populations thymiques DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺), DN4 (CD44⁻CD25⁻) («gaté» sur les cellules DN, CD4⁺CD8⁺). Adapté de (Hogquist et al., 2005).

CD44⁺ ; DN2, CD25⁺CD44⁺ ; DN3, CD25⁺CD44⁻ ; DN4, CD25⁻CD44⁻, **Fig.1.1.4**) (Rothenberg et al., 2008).

Les stades DN1 et DN2 sont caractérisés par une prolifération accrue qui est soutenue par le facteur soluble IL-7. Entre les stades DN2 et DN3, le locus de la chaîne β du TCR qui présentent de multiples segments variables (V) et segments de jonction (J) ainsi qu'un nombre limité de région D (Diversité) subit des réarrangements par recombinaisons jusqu'à obtenir un exon VDJ codant pour une chaîne β productive. Ces recombinaisons qui assurent la clonalité du TCR sont sous le contrôle des protéines Rag1 et Rag2 et d'un complexe enzymatique de réparation de l'ADN (DNA-PK, Ku, Artemis, XRCC4). Un pré-TCR composé de la chaîne β recombinée et d'une chaîne pré-TCR α (pT α) est alors exprimée à la surface des cellules DN3 qui diminuent leur prolifération. Cette étape constitue un point de contrôle du réarrangement β (sélection β) et nécessite une signalisation par le pré-TCR. Ainsi, en absence de protéines Rag1/2 fonctionnelles, un blocage complet de la production des lymphocytes T et des lymphocytes B (dont le réarrangement des chaînes d'immunoglobulines suit un processus similaire) est observé. Il est à l'origine de déficiences immunitaires sévères SCID (Severe Combined Immune Deficiency). Dans le cas où la signalisation induite au cours de la sélection β est productive, les cellules continuent leur différenciation vers la lignée TCR $\alpha\beta$ et perdent leur potentialité de différenciation vers la lignée des lymphocytes T $\gamma\delta$ dont je ne parlerai plus dans cette introduction. Après une étape d'expansion clonale (DN4), les cellules réarrangent le locus de la chaîne α du TCR et expriment alors une combinaison TCR $\alpha\beta$ unique. Le clonage de TCR spécifiques a permis de développer des outils aujourd'hui utilisés pour analyser les réponses T CD4⁺ ou T CD8⁺ dans un contexte de présentation antigénique spécifique. Ainsi, les TCR de souris OT-I (TCD8⁺) et OT-II (TCD4⁺) présentent les arrangements des segments variables V α 2V β 5 et sélectionnés pour reconnaître des peptides de classe-I (OVA₂₅₇₋₂₆₄,) ou de classe-II (OVA₃₂₃₋₃₃₉) respectivement présentés par les haplotypes du CMH H-2Kb et I-Ab (fond génétique C57BL/6). D'autres TCR spécifiques sont également utilisés.

Le passage au stade DP est marqué par l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8. A ce stade, et depuis le stade DN2, un certain nombre de molécules de signalisation requises pour la survie (Lck, CD3 γ,ϵ , ZAP70, LAT) mais aussi des effecteurs de la mort cellulaire programmée sont exprimés (Rothenberg et al., 2008). En effet, les cellules sont sélectionnées, avec l'aide des co-récepteurs CD4 et CD8, sur la capacité du TCR $\alpha\beta$ réarrangé à reconnaître le CMH de classe-I et le CMH de classe-II présentant les peptides du soi exprimés par cellules épithéliales corticales (cTEC). Ainsi, en absence de signalisation induite par cette reconnaissance, le progéniteur meurt par négligence (« neglect ») tandis que les autres cellules poursuivent leur différenciation par la sélection négative. Cette dernière a lieu dans la zone médullaire du thymus où les cellules épithéliales médullaire (mTEC) ont la capacité d'exprimer de manière ectopique les antigènes du soi. Ainsi, la sélection négative permet d'éliminer les clones présentant une forte affinité pour le soi. Les progéniteurs qui ont une affinité intermédiaire se différencient en lymphocytes T régulateurs (Treg). Le reste des cellules qui présentent une faible affinité pour les peptides du soi présentés par les CMH de classe-I ou de classe-II, se différencient en lymphocytes T CD4⁺ et en lymphocytes T CD8⁺. Les cellules matures qui représentent moins de 5% des progéniteurs générés par le thymus gagnent alors la périphérie. Elles expriment la molécule d'adhésion CD62L (L-selectine) qui permet l'entrée des lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires.

1.1.3. L'activation et la réponse lymphocytaire T tardive

1.1.3.1. *Initiation de la réponse T (signaux 1 et 2)*

L'initiation de la réponse immunitaire adaptative a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires où les lymphocytes T naïfs interagissent avec les cellules présentatrices environnantes, à l'aide de molécules d'adhésion comme par exemple LFA-1 (intégrines $\alpha_L\beta_2$) qui reconnaît la molécule ICAM-1 à la surface des cellules présentatrices. La reconnaissance par le TCR d'un clone T avec une affinité

suffisamment forte, d'un peptide antigénique présenté par le CMH (pCMH), constitue le premier signal d'activation que la cellule présentatrice fournit au lymphocyte T. Le second signal est apporté par des molécules de co-stimulation, la plus classique étant CD28 interagissant avec CD80/86. D'autres molécules de co-stimulation contribuent également à l'activation (ICOS, CD40L, LFA-1, CD2) ou inhibent l'activation (PD-1, CTLA-4) (L. Chen and Flies, 2013). Ces deux signaux permettent aux cellules T de passer du stade de cellules naïves à celui de cellules effectrices. Ils induisent en effet de nombreux changements de programme des lymphocytes T conduisant à la survie cellulaire et la prolifération des cellules, qui contribuent à l'augmentation du nombre de lymphocyte T effecteurs spécifiques de l'antigène présenté par les CPAg. Cette prolifération est notamment soutenue par l'induction après activation de la production et de la sécrétion autocrine/paracrine d'interleukine-2 (IL-2) et de la chaîne α de haute affinité (CD25) du récepteur à l'IL-2. Le passage d'un état naïf au stade de cellules effectrices est, de plus, accompagné par un changement dans l'expression des molécules d'adhésion. En effet, les expressions des molécules LFA-1, CD44 sont augmentées dans les cellules T effectrices tandis que l'expression de CD62L est diminuée permettant la recirculation des T en dehors des ganglions. L'augmentation de l'expression des chaînes d'intégrines $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) est associée à la fonction d'adhésion des lymphocytes aux cellules endothéliales arborant le ligand VCAM-1 aux sites d'inflammation.

Les fonctions auxiliaires des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs sont d'activer les différents composants de la réponse cellulaire et humorale.

Les lymphocytes T CD8⁺ assurent l'essentiel de l'activité cytotoxique adaptative envers les pathogènes ou les cellules infectées par ces pathogènes. La quantité et la qualité des signaux nécessaires pour activer des lymphocytes T CD8⁺ diffèrent de ceux fournis pour activer des lymphocytes T auxiliaires. La raison principale est que toutes les cellules nucléées expriment les molécules du CMH-I, elles représentent potentiellement des cibles pour les cellules T CD8⁺. C'est pour cela que l'activation des cellules T CD8⁺ requiert l'activation préalable et l'assistance des cellules T CD4⁺

auxiliaires. Ces cellules T CD4⁺ fournissent la première source d'IL-2 et la signalisation médiée par CD40, qui sont indispensables à l'activation des cellules T CD8⁺ en cellules T effectrices et mémoires.

La réponse humorale est caractérisée par la production d'anticorps en réponse à un antigène extracellulaire et cette réponse est médiée par les lymphocytes B. La différenciation des cellules B naïves peut être induite par des antigènes protéiques T-dépendants (TD) et des antigènes non protéiques T-indépendants (TI). Les lymphocytes B naïfs sont des CPAg qui capturent l'antigène via leurs immunoglobulines de surface encore appelées récepteurs des cellules B (BCR). Elles appréhendent les peptides antigéniques et les présentent aux cellules T CD4⁺. Les cellules T CD4⁺, activées préalablement par les DCs, vont alors induire la différenciation des cellules B en plasmocytes. Cette différenciation passe par l'interaction CD40/CD40L ainsi que la sécrétion par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires de diverses cytokines (notamment IL-4 et IL-21).

Enfin, l'expansion clonale des lymphocytes T et B activés conduit à la génération d'une fraction de cellules mémoires qui survivent après la clairance du pathogène. Ces cellules mémoires représentent un pilier de l'immunité acquise et permettent l'induction d'une réponse immunitaire plus rapide et plus intense dans le cas d'un nouveau « challenge » par le même pathogène. La clairance de ce dernier est donc plus efficace que lors de la réponse primaire.

Expérimentalement, plusieurs méthodes d'activation des lymphocytes T que je discuterai en **partie 4.1.2** sont utilisées au laboratoire. L'utilisation d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ , qui peuvent être associés à des anticorps ciblant des molécules de costimulation (anti-CD28) ou des co-récepteurs (anti-CD4), permet de forcer le regroupement des molécules de signalisation transmembranaires. Ce « cross-linking » induit la phosphorylation du TCR et la signalisation en aval qui peut être analysée par biochimie notamment. De plus, l'utilisation d'anticorps permet d'induire une réponse robuste des lymphocytes T (prolifération et production de cytokines). Par ailleurs, les

systèmes OT-I et OT-II sont des systèmes antigène-spécifiques que j'ai mentionné **en partie 1.1.2** et permettent d'analyser la réponse T *ex vivo* mais aussi *in vivo*. Enfin, le système allogénique ou « Mixed Lymphocyte Reaction » (MLR) constitue une approche antigénique non spécifique. Cette méthode consiste à co-cultiver des lymphocytes T avec des CPAg génétiquement différentes exprimant donc un haplotype du CMH différent de celui exprimé par le donneur de lymphocyte T. Une petite proportion de lymphocytes T est ainsi capable de reconnaître le CMH allogénique et d'induire la prolifération des cellules. Cette méthode est particulièrement utile pour l'activation de lymphocytes T primaires humains dans un contexte antigénique, mais peut également être utilisée avec des lymphocytes T de souris.

1.1.3.2. Différenciation des effecteurs T CD4⁺ (signal 3)

La différenciation finale des lymphocytes T CD4⁺ dépend fortement de l'état d'activation des DC (signal 3), au moment de l'interaction DC-T. En fonction des conditions d'activation, les DC produisent différents médiateurs cellulaires qui vont orienter la différenciation des cellules T. Ces facteurs sécrétés permettent d'adapter la réponse adaptative aux infections, qui ne sont pas toutes équivalentes entre elles. Les lymphocytes T CD4⁺ acquièrent ainsi des capacités effectrices dites auxiliaires ou « helper » dont la fonction centrale est de guider la réponse immunitaire. Au cours de la prolifération cellulaire, les T CD4⁺ se polarisent vers différentes sous-populations définies par le profil de cytokines qu'elles sécrètent et l'expression des facteurs de transcription nécessaires à leur polarisation. Les différenciations les plus décrites sont les Th1, Th2, Th17 et Treg (**Fig.1.1.5**).

Les lymphocytes T « helper » de type 1 (Th1) expriment le facteur de transcription Tbet et sécrètent principalement de l'IFN γ . Cette cytokine présente une activité pro-inflammatoire, qui induit l'augmentation des capacités de dégradation antigénique des cellules phagocytiques, l'augmentation de l'expression des molécules

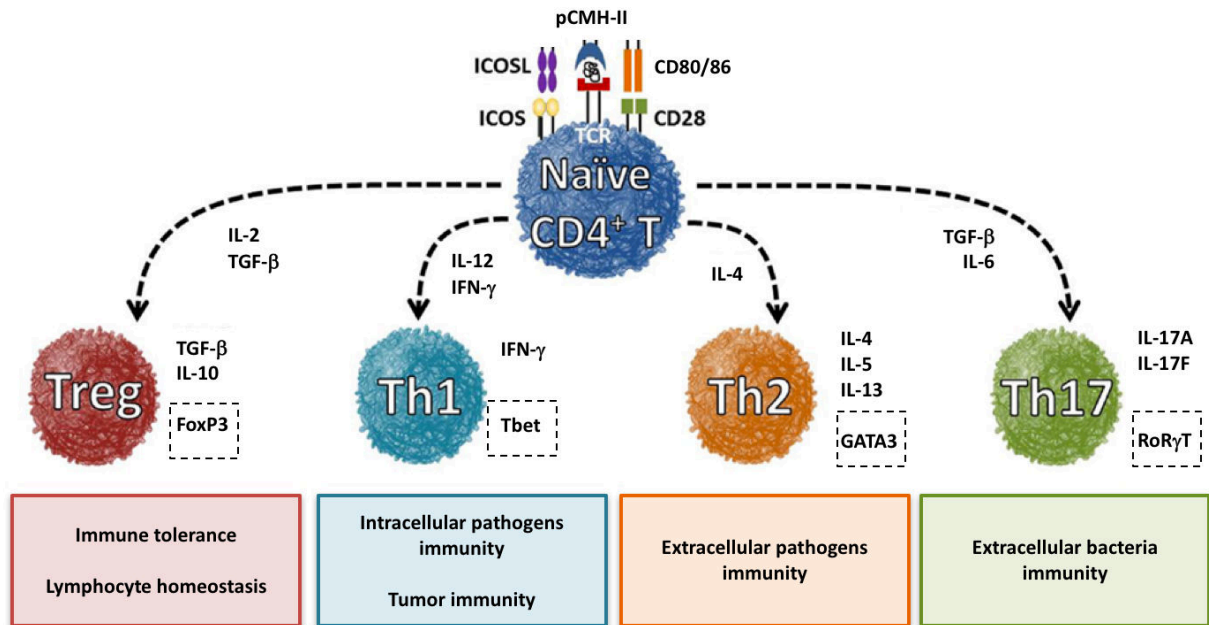


Figure 1.1.5. Polarisation des lymphocytes T CD4⁺ vers différentes sous-populations de T « helpers ».

Selon la force du signal d'activation médiée par le TCR, la co-stimulation et l'environnement cytokinique, les lymphocytes T CD4⁺ se différencient vers des sous populations aux propriétés effectrices différentes (encadré en pointillé, un facteur de transcription caractéristique de chaque sous population. Adapté de (Bailey et al., 2014).

du CMH et de la production d'anticorps IgG par les lymphocytes B. La réponse IFN- γ participe ainsi à la lutte contre des pathogènes intracellulaires (bactéries, virus, parasites) et des défauts liés à cette réponse induisent une susceptibilité à certains virus et aux mycobactéries. Le profil Th2 est caractérisé par l'expression du facteur de transcription Gata-3 et des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Cette réponse non inflammatoire est principalement induite par les parasites extracellulaires. Elle induit une activation lymphocytaire B et conduit à la production d'anticorps (isotypes IgG1, E et A) et stimule la croissance et la différenciation des mastocytes et granulocytes éosinophiles. Une dérégulation de la réponse Th2 est souvent associée aux allergies. La réponse Th17 est pro-inflammatoire et repose principalement sur l'expression du facteur de transcription RoR γ T. Par la production d'IL-17, les lymphocytes Th17 stimulent les cellules épithéliales, les kératinocytes et fibroblastes qui sécrètent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, GM-Csf, CXCL8, CXCL2) permettant le recrutement de granulocytes neutrophiles et de macrophages et augmentant leur génération dans la moelle osseuse. Enfin, un dernier profil est associé à la régulation de la réponse par les lymphocytes T régulateurs (FoxP3⁺ CD25⁺) qui proviennent du développement thymique (Treg naturels) ou sont polarisés à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en présence de TGF β , IL-10 (Treg induits). Cette sous-population met en œuvre plusieurs stratégies encore aujourd'hui débattues pour réguler négativement la réaction immunitaire. Notamment, les Treg sécrètent les cytokines IL-10 et TGF β inhibant les fonctions effectrices des lymphocytes T. Par ailleurs, la cytolyse des T effecteurs dépendante du granzyme B, la perturbation métabolique par compétition pour l'IL-2 et la régulation de la fonction et de la maturation de DCs ont entre autres été rapportées (Vignali et al., 2008). La perte de cette fonction régulatrice est associée à de profonds désordres auto-immuns chez l'homme et la souris. Notamment, la délétion du gène FoxP3 (Scurfin) chez la souris conduit à une auto-immunité létale engendrée par une hyper-réactivité des T CD4⁺ (Kim et al., 2006).

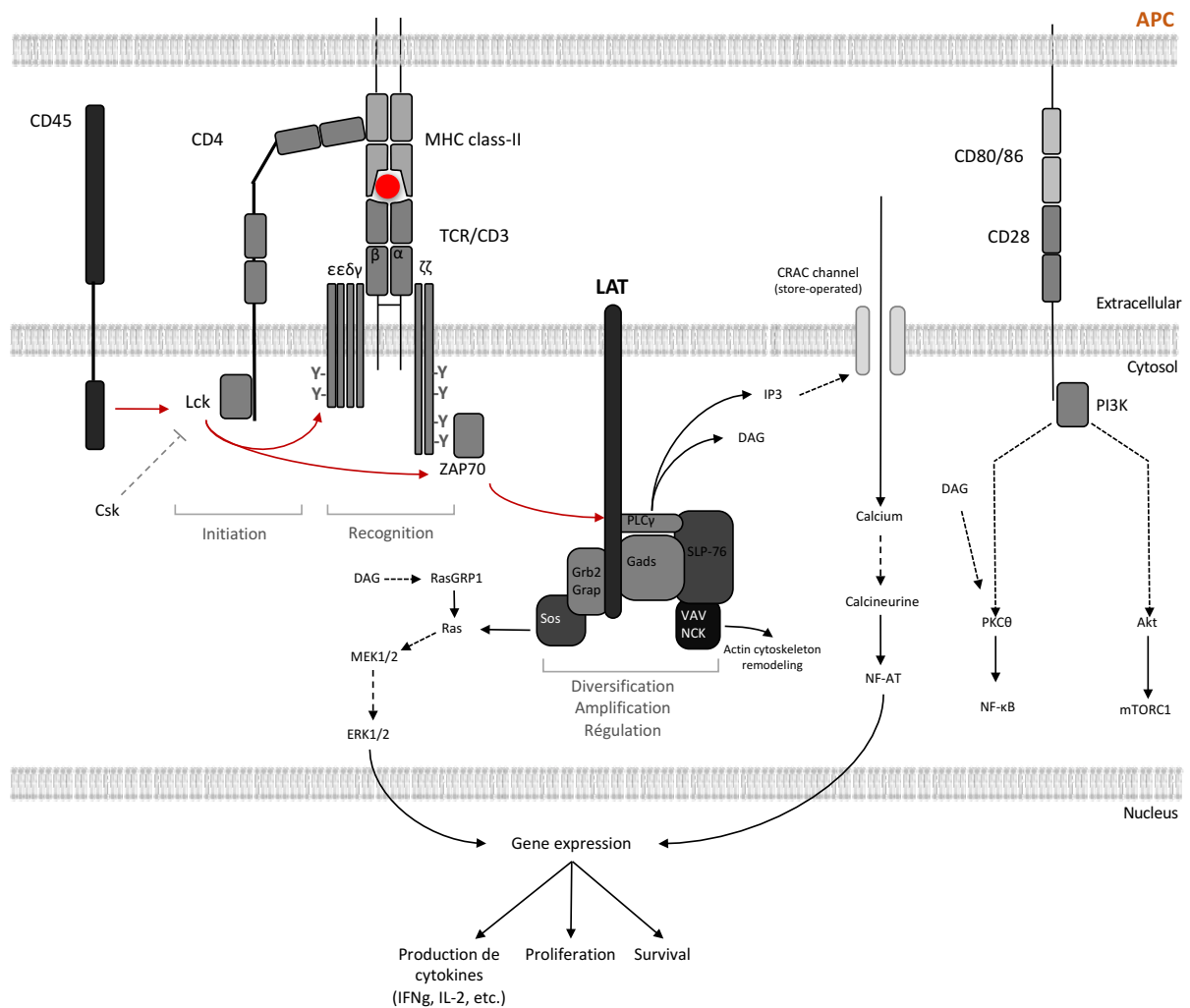


Figure 1.2.1. Vue classique de la signalisation lymphocytaire T.

La signalisation lymphocytaire T dépend d'un module de reconnaissance du peptide antigénique qui est constitué du complexe TCR/CD3, d'un module d'initiation de la signalisation impliquant p56^{Lck} dont l'activité peut être modulée par CD45 et Csk. p56^{Lck} phosphoryle les domaines des chaînes CD3 associées au TCR, ce qui permet notamment le recrutement de ZAP-70 qui phosphoryle à son tour LAT. L'adaptateur LAT constitue le module de diversification et d'amplification du signal provenant du TCR en induisant les voies calciques, MAPK et NF- κ B, mais aussi la réorganisation du cytosquelette d'actine.

1.2. Signalisation lymphocytaire T

1.2.1. La signalisation lymphocytaire T proximale

La signalisation proximale au cours de l'activation des lymphocytes $T_{\alpha\beta}$ peut être subdivisée en trois modules (Malissen et al., 2014) (**Fig.1.2.1**).

1.2.1.1. Le module de reconnaissance antigénique

Le premier module constitue la reconnaissance du peptide antigénique associé au CMH (pCMH) par les chaînes $\alpha\beta$ du TCR. Cependant, la partie intracellulaire de chacune des chaînes α et β est particulièrement courte et ne possèdent pas d'activité enzymatique. Ainsi, afin de permettre la signalisation, le $TCR_{\alpha\beta}$ est associé aux chaînes $CD3\gamma\delta\epsilon\epsilon\zeta\zeta$ dont les parties intracellulaires portent plusieurs résidus tyrosines formant des motifs ITAMs indispensables à l'activation lymphocytaire (Guy et al., 2013). Plusieurs études faites sur des lymphocytes T primaires de souris exprimant un TCR transgénique ont montré que la signalisation intracellulaire ainsi qu'une réponse cellulaire robuste mesurée par la sécrétion de cytokines (IL-2 et TNF- α) ne demanderaient qu'un nombre très limité de pCMH proche de 1 (J. Huang et al., 2013; Manz et al., 2011).

1.2.1.2. Le module d'initiation de la signalisation

Le second module d'activation a pour rôle d'initier la signalisation par la phosphorylation des domaines ITAMs portés par les chaînes CD3 associées au TCR. Cette fonction est assurée par la protéine $p56^{Lck}$ de la famille Src. Cette kinase dont la palmytylation régule sa localisation membranaire, s'associe aux co-recepteurs CD4 ou CD8 et avec le pCMH (Artyomov et al., 2010; Hamad et al., 1998; Q.-J. Li et al., 2004; Veillette et al., 1989; Wooldridge et al., 2005) permettant son recrutement aux sites

d'activation du TCR. La fonction de p56^{Lck} est régulée par une tyrosine inhibitrice (Y505) déphosphorylée par la phosphatase CD45 et induisant une conformation ouverte de la protéine. Une seconde tyrosine (Y394) située au niveau du site catalytique de la molécule est trans-autophosphorylée rendant p56^{Lck} fonctionnellement active (Palacios and Weiss, 2004). Cette tyrosine serait également la cible de CD45 qui contribuerait donc aussi à la régulation négative de l'activité de p56^{Lck} (Chakraborty and Weiss, 2014; McNeill et al., 2007). De plus, la phosphorylation du résidu Y505 est également régulée par la kinase CSK. Une balance entre déphosphorylation de cette tyrosine par CD45 et phosphorylation par CSK permet une régulation étroite de p56^{Lck} et de l'initiation de la signalisation. Notamment, les souris déficientes pour CSK présentent une activation constitutive de leurs lymphocytes T alors que des cellules T n'exprimant pas CD45 échouent à initier une signalisation T (Brownlie and Zamoyska, 2013; Hermiston et al., 2003; Schmedt et al., 1998; Schmedt and Tarakhovsky, 2001). Bien que les fonctions de CD45 et CSK soient antagonistes, ces molécules agiraient comme des gardiens de l'initiation de la signalisation T et contribueraient à l'établissement du seuil d'activation lymphocytaire (Brownlie and Zamoyska, 2013; McNeill et al., 2007). Par ailleurs, une étude d'intérêt menée par le laboratoire d'Oreste Acuto a montré qu'à l'état basal, une proportion non négligeable de p56^{Lck} sous forme active (environ 40%) est présente dans les cellules T Jurkat, les lymphocytes T CD4⁺ primaires humains ainsi que dans les thymocytes de souris (Nika et al., 2010). Cette proportion basale relativement élevée de p56^{Lck} phosphorylée sur la tyrosine Y394 (et la tyrosine Y505) n'est cependant pas augmentée après l'engagement du TCR. Cela suggère que le transport et la localisation de p56^{Lck} doivent aussi être régulés à l'état basal et dans les conditions d'activation. A ce jour, il n'est pas encore bien compris comment cet état basal est rompu par la reconnaissance du pCMH par le TCR et comment s'initie la signalisation. Le groupe de Katarina Gaus propose ainsi que la conformation elle-même de Lck sous forme active contribue à sa ségrégation dans des agrégats (clusters) séparés du TCR à l'état basal et de la phosphatase CD45 (Rossy et al., 2013a). En présence d'un pCMH agoniste, ces clusters se mêlent aux molécules de TCR induisant une signalisation en aval.

La phosphorylation du complexe TCR/CD3 induit le recrutement de ZAP-70 aux domaines ITAM des chaînes ζ (Chan et al., 1991; 1992). ZAP-70 est une protéine tyrosine kinase qui présente une fonction centrale dans la transduction du signal proximal provenant du TCR (Fischer et al., 2010; H. Wang et al., 2010). Elle comporte deux domaines SH2 nécessaires à son recrutement au TCR et un domaine catalytique séparés des domaines SH2 par un interdomaine. Plusieurs résidus tyrosines régulent la fonction de ZAP-70. En effet, l'interdomaine comporte notamment les tyrosines Y292, Y315 et Y319. La fonction d'autoinhibition de cette dernière par le repliement de ZAP70 dans une conformation fermée a été montrée par l'analyse des effets de sa mutation sur sa structure cristallographique et la réponse T tardive (Deindl et al., 2007; Di Bartolo et al., 1999). De plus, la tyrosine Y315 contribue au recrutement efficace de ZAP-70 aux chaînes ζ du TCR. Par ailleurs, l'activité catalytique de la fonction de ZAP-70 est régulée par les deux tyrosines Y492 et Y493 qui sont phosphorylées par p56^{Lck} (Chan et al., 1995; Duplay et al., 1994; Fischer et al., 2010; Weil et al., 2003). Ainsi, lors du recrutement de ZAP-70 aux sites d'activation du TCR, et la phosphorylation de ses résidus tyrosines par p56^{Lck}, ZAP-70 prend une conformation ouverte et sa fonction catalytique s'active pour phosphoryler différents substrats dont le plus connu est la molécule LAT (« Linker for activation of T cells ») (W. Zhang et al., 1998).

1.2.1.3. Le module d'amplification et de diversification du signal

LAT est une molécule d'échafaudage constituant le dernier module de la signalisation proximale dont les rôles sont la diversification et l'amplification du signal provenant du TCR. En effet, il en émerge différentes voies de signalisation distales dont la plupart des effecteurs présentent une expression ubiquitaire : les voies de la signalisation calcique mettant en jeu le facteur de transcription NF-AT, l'induction du facteur de transcription NF- κ B et du complexe mTORC1 ainsi que les voies MAPK. Ces voies sont indispensables à la survie cellulaire, à la prolifération, à la sécrétion de cytokines et d'une manière générale à la régulation positive ou négative du transcriptome nécessaire à la réponse et la différenciation des cellules T.

1.2.2. Les voies en aval de LAT induites par le TCR

1.2.2.1. *La voie calcique*

L'induction du TCR induit dès les premières secondes un flux calcique dépendant de l'activité de la phospholipase $C\gamma 1$ ($PLC\gamma 1$) (Feske, 2007). $PLC\gamma 1$ catalyse la réaction de transformation du Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol membranaire (DAG) et en inositol triphosphate soluble (IP₃) (**Fig.1.2.1**). La fixation de ce dernier aux récepteurs à l'IP₃ présents au niveau du réticulum endoplasmique induit une sortie dans le cytosol du calcium stocké dans ce compartiment. Cette mobilisation du calcium n'est cependant pas suffisante à induire une signalisation calcique efficace. C'est la déplétion du stock de calcium dans le réticulum qui induit un signal d'ouverture du canal calcique CRAC formé par un homotétramère des sous-unités ORAI1 et présent à la membrane plasmique. Récemment, cette entrée de calcium dite « capacitive » (en anglais, SOCE pour « Store-Operated Calcium Entry ») a été liée à la fonction de la protéine transmembranaire STIM1 qui est entre autres présente à la membrane du réticulum endoplasmique. La partie luminale de la protéine comporte un motif sensible au calcium. Ainsi, une diminution du stock de calcium dans le réticulum conduit à l'interaction STIM1-ORAI1, l'ouverture du canal calcique CRAC nécessaire à l'entrée massive et transitoire de calcium dans le cytosol. Plusieurs immunodéficiences sévères liées à des mutations de ORAI1 ont été décrites (McCarl et al., 2009; Picard et al., 2009; Thompson et al., 2009).

L'élévation importante du calcium dans le cytosol induit l'activation de la phosphatase calcineurine, qui dé-phosphoryle le facteur de transcription NF-AT permettant sa translocation dans le noyau. Cette translocation induit la transcription de nombreux gènes dont celui de l'IL-2 (Chow et al., 1999).

Expérimentalement, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium peut être forcée avec des drogues comme la thapsigargine qui, en inhibant les pompes calciques du réticulum endoplasmique, libère le calcium de ce réservoir

intracellulaire, ou la ionomycine, un ionophore qui induit l'entrée du calcium extracellulaire dans la cellule.

1.2.2.2. La voie PI3Kinase

La costimulation par CD28 (**Fig.1.2.1**), qui se lie aux molécules CD80/86 exprimées par des CPAg « activées » engendre l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dont la fonction est d'ajouter un groupement phosphate au PIP2. Le PIP3 produit conduit au recrutement de la protéine PDK1 impliqué dans deux voies distinctes. PDK1 induit le recrutement de Akt qui est impliquée dans l'induction de la voie mTORC1. Cette voie promeut la croissance cellulaire, la survie et la prolifération des cellules. PDK1 phosphoryle également l'isoforme θ de la famille des protéines kinases C (PKC θ) dont l'activation nécessite également le DAG provenant de la voie PLC γ . L'activité kinase de PKC θ induit la formation du complexe CARMA1-BCL10-MALT1 qui se lie au complexe I κ B kinase (IKK) dont la sous-unité IKK β induit la phosphorylation et la dégradation de I κ B (Thome and Tschopp, 2003). La dégradation protéasomale de I κ B permet alors la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau et ainsi la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la réponse T dont l'IL-2 (Baeuerle and Baltimore, 1988a; 1988b; Paul and Schaefer, 2013).

L'activation des PKC dont PKC θ peut être induite avec du phorphol myristate acétate (PMA), un analogue du DAG. L'utilisation conjuguée de PMA et ionomycine est communément utilisée pour activer des cellules T indépendamment du TCR/CD28.

1.2.2.3. La voie Ras/MAPKinase

Trois familles de MAPKinases sont exprimées ubiquitairement : les MAP kinases ERK1/2 (External Regulated-protein Kinases), les MAPKinases p38 et les

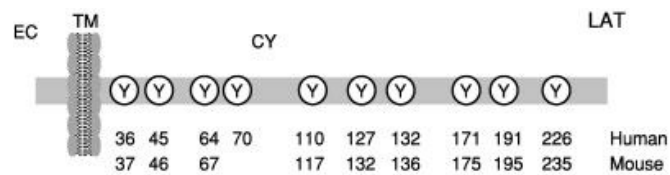


Figure 1.2.2. Structure de l'adaptateur LAT

LAT est composée d'un segment extracellulaire N-terminal d'une longueur de 4 acides aminés (EC), d'un domaine transmembranaire (TM), d'un segment juxtamembranaire portant 2 cystéines C26 et C29 palmitylées (non représentées) et d'un segment intracellulaire (CY) portant les résidus tyrosine (Y) conservés chez l'homme et la souris, et numérotés selon leur emplacement dans la séquence peptidique (Malissen et al., 2005).

MAPKinases JNK (c-Jun N-ter terminales kinases) (Rincón et al., 2001). Leur activation est induite par des phosphorylations en cascades de MAPKKK et MAPKK et conduit à l'activation de facteurs de transcription comme AP-1, et Jun dans le noyau et la transcription de gènes comme l'IL-2. L'initiation des voies MAPKinases est fortement associée à l'activité de petites GTPases. En particulier, l'activation de la voie ERK1/2 est induite par la petite GTPase Ras qui est sous forme active lorsqu'elle est liée à une molécule de GTP. L'échange d'une molécule de GDP par une molécule de GTP est assuré par les protéines GEF (« Guanine Exchange Factor »). Deux GEFs sont impliquées dans ce processus, Sos (« Son of sevenless ») et RasGRP (Ras guanyl nucleotide-releasing protein) (**Fig.1.1.5**).

1.2.3. L'adaptateur LAT : formation des signalosomes

La protéine LAT est exprimée dans plusieurs types cellulaires allant des lymphocytes T, des cellules NK, des mégacaryocytes, aux mastocytes dans lesquels elle joue un rôle critique dans la signalisation et la réponse cellulaire (Facchetti et al., 1999; Saitoh et al., 2000; B. S. Wilson et al., 2001; W. Zhang et al., 1998).

1.2.3.1. Structure de LAT, phosphorylation de résidues tyrosines & formation des signalosomes LAT

LAT a été identifiée en 1998 par l'équipe de Lawrence E. Samelson comme le substrat direct de ZAP-70 (W. Zhang et al., 1998). Cette protéine est composée d'une partie N-terminale très courte de 4 acides aminés, ce qui ne rend pas possible le marquage extracellulaire de la forme endogène de LAT. Cette partie est suivie d'une portion transmembranaire et d'un domaine C-ter cytosolique portant 10 résidus tyrosines dont 5 sont phosphorylables chez la souris (m117, mY136, mY175, mY195, mY235) et l'homme (h110, hY132, hY171, hY191, hY226) (**Fig.1.2.2**). La fonction de ces tyrosines a très tôt été déterminée comme primordiale dans le recrutement d'un certain nombre de molécules de signalisation et d'adaptateurs.

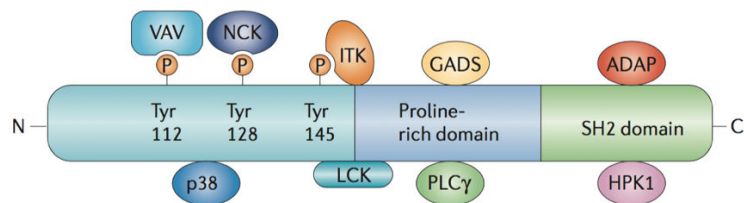


Figure 1.2.3. Structure de SLP-76.

SLP-76 est capable de se lier à différentes protéines de la signalisation comme PLC γ et ITK impliquées dans la signalisation calcique, VAV et NCK permettant le remodelage du cytosquelette d'actine, ainsi que l'adaptateur GADS qui interagit avec LAT, et HPK1 qui recrute les protéines 14-3-3. (Koretzky et al., 2006)

Il a particulièrement été montré que les molécules PLC γ 1, GADS et SLP76, la sous-unité p85 de PI3-K, ainsi que les protéines d'échafaudage Grb2 et Grap associées à la voie Sos/Ras/MAPK interagissent avec ces tyrosines. Le modèle qui a été très largement utilisé pour l'analyse de la fonction de ces tyrosines a été les cellules T Jurkat ayant perdu l'expression de LAT après mutagenèse (JCaM2.5) (Goldsmith and Weiss, 1988; Marek-Bukowiec et al., 2016). Par reconstitution de ces cellules avec des constructions présentant différentes combinaisons de tyrosines mutées, il a pu être mis en évidence que la tyrosine hY132 (mY136) présente une fonction critique dans le recrutement de PLC γ 1. Ainsi, sa mutation induit la perte de la réponse calcique et de la transcription dépendante de NF-AT mais aussi de la voie Ras/MAPK/Erk1/2 (Finco et al., 1998; Mingueneau et al., 2009; W. Zhang et al., 2000; Zhu et al., 2003). Par ailleurs, l'adaptateur GADS est recruté sur les tyrosines Y191 et Y171 et interagit avec l'adaptateur SLP76 (S. K. Liu et al., 1999). Les mutations des tyrosines Y171 et 191 conduisent à une perte de la réponse calcique et il a été observé que SLP76 et GADS contribuent de manière synergique à la voie calcique suggérant que ces deux adaptateurs jouent un rôle dans la stabilité du complexe LAT-PLC γ 1-SLP76-GADS (Lin and Weiss, 2001). SLP-76 présente cependant d'autres fonctions liées à la présence de tyrosines phosphorylables dans sa partie N-terminale (**Fig.1.2.3**). Ces tyrosines en font une molécule d'échafaudage importante pour le recrutement d'I κ k (Inducible T-cell kinase) dont le substrat est PLC γ 1 et permet ainsi de renforcer la signalisation calcique (Andreotti et al., 2010; Koretzky et al., 2006). Outre sa fonction dans la signalisation calcique, SLP76 joue également un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette d'actine aux sites d'activation du TCR par le recrutement des molécules Vav1, NCK et WASp (Barda-Saad et al., 2010). Enfin, SLP76 présente également un site de recrutement de la sérine/thréonine HPK1 dont l'activité enzymatique conditionne l'interaction tardive de SLP-76 avec la protéine 14-3-3 et la dissociation du complexe GADS-SLP76 de l'adaptateur LAT. Ce mécanisme semble important dans la régulation négative de la signalisation T (Di Bartolo et al., 2007; Lasserre et al., 2011).

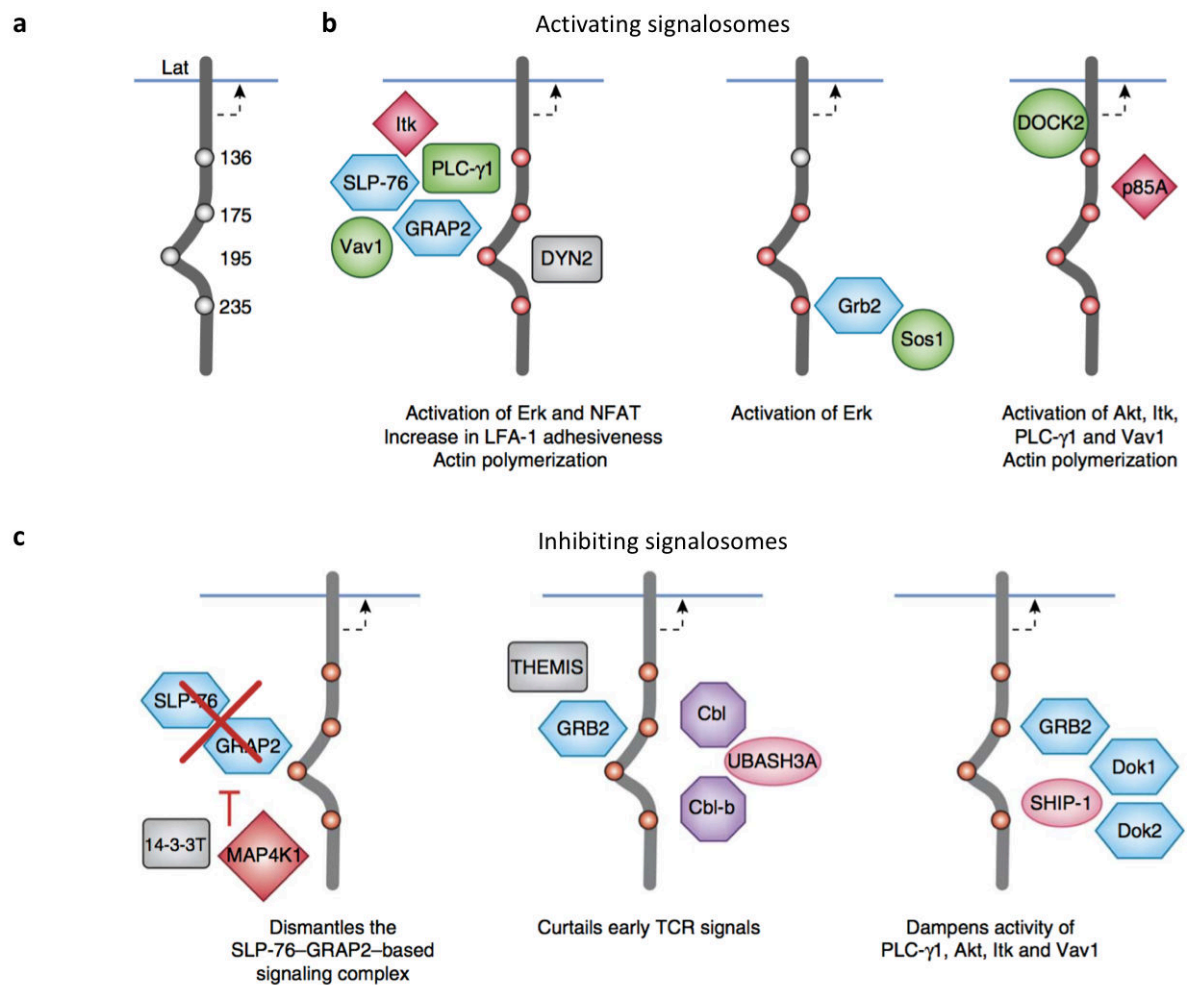


Figure 1.2.4. Signalosomes LAT impliqués dans la régulation positive et négative de la signalisation induite par le TCR.

(a) Structure de l'adaptateur LAT chez la souris montrant les tyrosines phosphorylées par ZAP-70. (b) Exemples de signalosomes LAT contribuant positivement à la signalisation T. (c) Exemples de signalosomes LAT régulant négativement la signalisation lymphocytaire T. Adapté de (Malissen et al., 2014).

Enfin, la phosphorylation des tyrosines portées par LAT permet le recrutement de Grb2. Ce dernier est un adaptateur interagissant avec différentes molécules de signalisation. Son interaction avec Sos est importante pour l'induction de la voie Ras/MAPK (W. Zhang et al., 2000; 1998; Zhu et al., 2003). Cependant, Grb2 semble avoir une fonction antagoniste puisque cet adaptateur interagit également avec la phosphatase SHIP-1. Cette dernière induit également le recrutement de Dok2, un adaptateur qui régule négativement la voie Akt mais induit aussi une boucle de rétrocontrôle régulant ZAP-70 et CD3 ζ (Dong et al., 2006). La perte d'expression de Dok-1 et Dok-2 conduit à une augmentation de la production d'IL-2 et de la prolifération des lymphocytes T chez l'homme et une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ , et d'IL-4 chez la souris (Yasuda et al., 2007). De plus, la molécule THEMIS, dont le rôle a principalement été étudié dans le développement thymique des lymphocytes T est également recrutée au complexe de signalisation LAT *via* Grb2 et présenterait une fonction de régulation négative de la signalisation (Fu et al., 2013a; Lesourne et al., 2009; Paster et al., 2013). Bien que sa fonction moléculaire reste encore à préciser, THEMIS recruterait la tyrosine-phosphatase SHP-1 et régulerait ainsi la signalisation proximale du lymphocyte T. Par ailleurs, il a également été suggéré que la combinaison de molécules adaptatrices (Gads/Grb2/Gab2) différentes de la combinaison (Grb2/Grap), qui est impliquée dans la signalisation positive, permettrait le recrutement de tyrosine-phosphatases telles que SHP2 participant à la régulation négative de la signalisation par le complexe LAT (Yamasaki et al., 2003).

Le recrutement de Grb2 au complexe de signalisation LAT a été attribué aux résidus tyrosines Y171, Y191 et Y226. On note ici que les sites de recrutement des différentes molécules se chevauchent. Ainsi, ces observations impliquent que plusieurs complexes LAT appelés signalosomes peuvent co-exister et/ou se succéder dans le temps et réguler positivement ou négativement la signalisation passant par LAT (**Fig.1.2.4**). Récemment, une étude a apporté une contribution majeure à la compréhension des signalosomes LAT et a été réalisée dans des lymphocytes T CD4⁺ primaires de souris, contrairement aux autres modèles de lignées cellulaires humaines

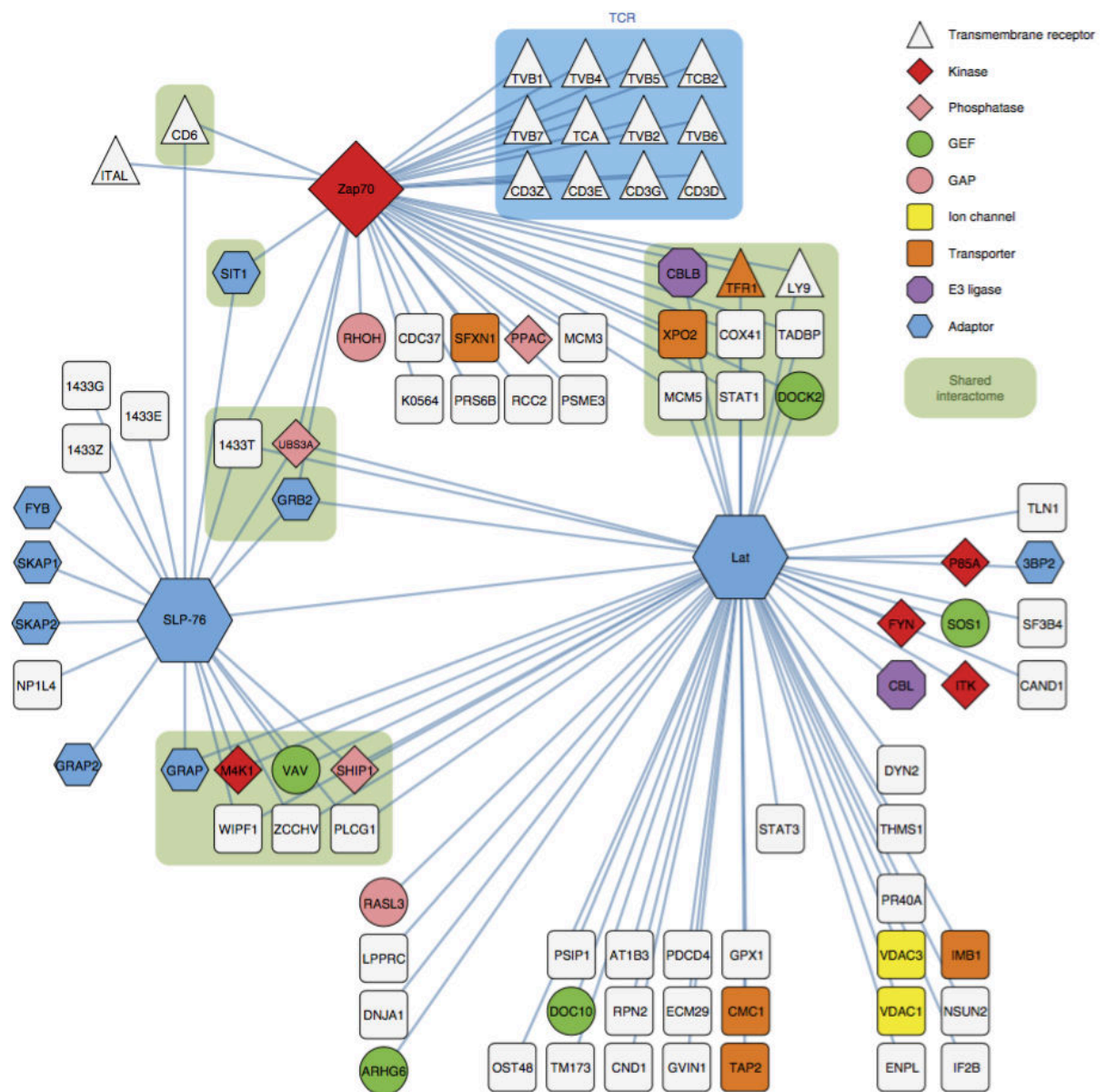


Figure 1.2.5. Interactomes de ZAP-70, SLP-76 et LAT.

Les interactomes ont été analysés par spectrométrie de masse après purification par affinité des protéines ZAP-70, SLP-76 et LAT, étiquetées avec le peptide OneStrepTag (OST), issues de lymphocytes CD4⁺ de souris activés et non activés. (Roncagalli et al., 2014)

utilisés précédemment (Malissen et al., 2014; Roncagalli et al., 2014). L'approche a été basée sur l'analyse protéomique dans des cellules T CD4⁺ de souris exprimant les protéines « appâts » ZAP-70, SLP-76 et LAT associées à une étiquette propice à leur purification par affinité (OST, One StrepTag). Dans les cellules au repos ou activées pendant différents temps (30,120, 300s), les interactomes relatifs à chacune des proies ont été analysés avec une marge d'erreur très faible. Ainsi, un réseau de 90 protéines reliées par 112 interactions a pu être mis en évidence (**Fig.1.2.5**). Des interactions décrites (25% des proies obtenues) auparavant ont ainsi pu être confirmées. Des interactomes partagés entre ZAP-70, SLP-76 et LAT ont pu être également confirmés et de manière intéressante, les résultats ont mis à jour de nouvelles interactions avec LAT parfois inattendue comme l'adaptateur STING participant à la détection à l'ADN cytosolique et à la réponse IFN de type I, mais aussi les transporteurs de calcium voltages dépendants présents au niveau des mitochondries (VDAC1 et VDAC2). Par ailleurs, l'interaction du récepteur à la transferrine (TfR, CD71), un marqueur des compartiments intracellulaires de recyclage (Ajioka and Kaplan, 1986), interagirait également avec LAT. Enfin, l'approche protéomique quantitative employée a également permis une analyse cinétique des interactomes mettant en évidence des interactions constitutives (SLP-76 –GADS ou LAT-TfR), des interactions précoces et transitoires (LAT-Vav1, LAT-DOC10), des interactions moins précoces mais stables dans le temps (LAT-PLC γ 1, LAT-PI3K, LAT-Grb2, LAT-Sos) voire des interactions un peu plus tardives (SLP-76 –14-3-3).

1.2.3.2. Autres modifications post-traductionnelles contribuant à la fonction de LAT

Palmitoylation de LAT

LAT présente dans sa région juxtamembranaire deux cystéines C26 et C29 qui sont chacune acylée par l'ajout d'un acide palmitique (Levental et al., 2010; W. G. Zhang et al., 1998). Cette palmitoylation conditionne la localisation de LAT dans les rafts lipidiques et la mutation de ces résidus cystéine conduit à une forte diminution de

la phosphorylation de LAT et de la signalisation T. Elle jouerait notamment un rôle central dans le transport de LAT vers la périphérie des lymphocytes T. Il a en effet été montré dans plusieurs études une rétention de ces formes mutées au niveau de l'appareil de Golgi dans les cellules T au repos (Chum et al., 2016; Hundt et al., 2009; Tanimura et al., 2006). Cela constitue une preuve importante pointant le rôle de la localisation de LAT et, d'une manière plus générale, de la régulation de son transport dans l'activation lymphocytaire T. D'autre part, la mono-palmytation de la cystéine C26 semble être capable de reconstituer un transport de LAT à la membrane plasmique, ainsi que sa fonction (Hundt et al., 2009).

Ubiquitination de LAT

LAT est ubiquitinée au niveau de deux résidus lysines K52 et K204. Il a été supposé que les ubiquitines ligases de la famille des Cbl (c-Cbl et Cbl-b) soient impliquées dans ce processus. Ces modifications post-traductionnelles de LAT induirait son internalisation et sa dégradation (Balagopalan et al., 2011; Brignatz et al., 2005). Les travaux de L. Balagopalan et L. E. Samelson ont montré que les mutations des lysines K52 et K204 chez l'homme et la souris conduisent à une augmentation de la signalisation T (phosphorylation de PLC γ 1 et ERK) et une réponse T CD4⁺ (polarisation Th1) et T CD8⁺ (cytotoxicité) fortement augmentées *in vitro* et *ex vivo* démontrant que l'ubiquitination de LAT contribue à modérer la signalisation T (Balagopalan et al., 2011; Kunii et al., 2013; Rodriguez-Peña et al., 2015). Cependant, l'expression transgénique chez la souris d'une forme de LAT résistante à l'ubiquitination n'a montré que peu d'effets dans la réponse *in vivo*. Le rôle de ce processus de régulation de la signalisation T reste donc à déterminer dans la réponse immunitaire adaptative.

Phosphorylation de LAT sur résidu thréonine

Dans les lymphocytes T humains, le résidu thréonine Thr155 est phosphorylé. Ce résidu serait la cible d'une boucle de rétrocontrôle de la kinase ERK qui déstabiliserait l'interaction PLC γ 1-LAT (Matsuda et al., 2004). Sa mutation conduit en

effet à l'augmentation du flux calcique et de l'activité du promoteur ciblé par NF-AT. La phosphorylation du résidu Thr155 s'ajoute donc à la liste des régulations négatives de la signalisation passant par LAT. Ce résidu n'est cependant pas présent chez la souris.

1.2.3.3. Syndromes auto-immuns associés à LAT et interprétations

La grande majorité des études de la fonction de LAT a été réalisée chez l'homme et dans les cellules Jurkat ou JCaM2.5. Ces modèles présentent un grand nombre d'avantages mais aussi des limites. Notamment, l'analyse de la fonction de LAT dans une réponse immunitaire à l'échelle d'un organisme n'est pas possible dans de tels modèles, sauf lorsque des patients présentent des mutations, comme nous le verrons plus tard. Des souris modifiées génétiquement exprimant une forme mutée de LAT résistante à la phosphorylation de la tyrosine Y136 (Y136F) ont ainsi été générées par plusieurs laboratoires (Aguado et al., 2002; Sommers et al., 2002). Cette mutation qui altère très fortement la signalisation calcique ainsi que la voie Ras/MAPK conduit *in vivo* à des défauts de développement thymique très précoces au stade DN3 suggérant que la signalisation du pré-TCR lors de la sélection β était déjà déficiente (Sommers et al., 2005) confirmant les résultats obtenus plus tôt dans les souris LAT^{-/-} (W. Zhang et al., 1999). Cependant, une proportion de cellules réussit à passer la transition DN-DP et l'analyse plus avant a permis de mettre en évidence des défauts associés aux sélections positive et négative appuyant le rôle important de la signalisation dépendante de LAT dans ces étapes du développement thymique (Shen et al., 2009; Sommers et al., 2005). De manière inattendue, la petite proportion de lymphocytes T passant à la périphérie présente un phénotype hyper-réactif associé à la perte de l'expression de CD62L et de CD95, à l'augmentation de l'expression de CD44 et CD5, ainsi qu'à une expansion polyclonale incontrôlée. De plus, ces cellules T présentent un très fort biais de différenciation Th2 (expression d'IL-4, d'IL-13, d'IL-10 mais pas d'IFN- γ). Ce phénotype hyperactif conduit à une activation polyclonale du

compartiment des lymphocytes B dont une partie présente, dans les conditions physiologiques, une capacité autoréactive. Cette activation conduit à la sécrétion massive d'anticorps IgG1 et IgE conduisant à un syndrome d'autoimmunité (glomérulonephrites, et atteinte du foie et des poumons) (Genton et al., 2006). Il a été proposé que ces effets soient dus à des défauts de la sélection thymique générant des lymphocytes T régulateurs non fonctionnels (Chuck et al., 2010; Koonpaew et al., 2006; Shen et al., 2010). Cependant, même si un rôle de LAT n'est pas à exclure dans la fonctionnalité suppressive des Tregs, la présence de T régulateurs fonctionnels $LAT^{+/+}$ ne permet pas de réprimer l'hyperactivité des $T CD4^+$. Par ailleurs, l'autoimmunité a été retrouvée également dans des modèles où la forme mutée LAT^{Y136F} est exprimée uniquement dans les lymphocytes T matures (Mingueneau et al., 2009; Y. Wang et al., 2008). Ceci a permis de déterminer que le phénotype hyperactif des lymphocytes T mutés n'est pas uniquement lié à un défaut de différenciation thymique.

La conversion pathogénique des $T CD4^+ Y136F$ nécessiterait l'interaction MHC-II-TCR mais une fois ces lymphocytes amorcés, l'induction du TCR n'est plus nécessaire alors que la costimulation par l'interaction CD28-CD80/86 est indispensable au phénotype (Chevrier et al., 2012; Liang et al., 2013; Mingueneau et al., 2009; Y. Wang et al., 2008). Enfin, ce défaut n'est pas lié à la simple absence d'interaction LAT- $PLC\gamma 1$ et donc à la participation des autres tyrosines mY175, mY195, mY235 puisque l'induction à la périphérie de lymphocytes $T CD4^+ LAT^{-/-}$ conduit aux mêmes dérégulations que dans les souris LAT^{Y136F} . De manière intéressante, l'activation des lymphocytes $T CD4^+$ provenant de ces souris avec des anticorps anti-CD3 ϵ et anti-CD4 mimant un pCMH induit des niveaux très réduits voire une absence de phosphorylation de $PLC\gamma 1$ et ERK1/2 mais une phosphorylation de SLP76 et Akt (Mingueneau et al., 2009), prouvant l'existence de voies de signalisation du TCR indépendantes de LAT.

Récemment, une mutation induisant l'expression d'une forme tronquée de la partie C-terminale de LAT a été déterminée chez l'homme (Keller et al., 2016). A l'inverse, des mutations induites chez la souris, les trois patients analysés montraient

précocement une lymphopénie de $T_{\alpha\beta}$ conduisant à une immunodéficience relativement sévère. Cependant, l'un des patients présente une forme plus tardive de dérégulation lymphocytaire $T_{\gamma\delta}$ également associée à un biais Th2 ainsi qu'une hyperprolifération. Les lymphocytes $T_{\alpha\beta}$ de patients présentent par ailleurs une diminution de la signalisation calcique qui n'est cependant pas totalement inhibée à l'inverse des souris LAT^{Y136F} et $LAT^{-/-}$. Cela suggère des différences de régulation de la signalisation entre les lymphocytes T humains et de souris. Notamment, dans la lignée humaine JCaM2.5, l'absence de LAT n'inhibe pas la signalisation calcique si la localisation de SLP-76 est forcée à la membrane plasmique (Boerth et al., 2000).

L'ensemble des résultats résumés plus haut permet de poser deux constats/hypothèses :

(i) en absence de LAT, une activation initiée par le TCR conduit à une réponse T dérégulée. Cela permet de postuler que la fonction de l'adaptateur LAT n'est pas seulement à l'origine d'une régulation positive de la signalisation lymphocytaire T mais serait aussi importante dans la régulation négative de celle-ci. Cela est appuyé par le fait que LAT contribue à la formation de multiples signalosomes aussi bien activateurs que régulateurs (**Fig.1.2.5**) et participe à des boucles de rétrocontrôle auxquelles LAT est associée, comme mentionné précédemment. Par ces mécanismes, LAT contribuerait à réguler le seuil d'activation des lymphocytes T en périphérie.

(ii) une signalisation à l'origine d'une hyperactivité des T et d'un programme de différenciation Th2 est capable d'être induite dans les T posant l'hypothèse d'une ou de plusieurs voies de signalisation indépendantes de LAT.

1.2.3.4. Les voies indépendantes de LAT proposées

La costimulation par CD28

La pathologie associée à LAT est prévenue dans un fond $CD80/86^{-/-}$ ou bien lorsque que les cellules T n'expriment pas CD28 (Chevrier et al., 2012; Mingueneau

et al., 2009; Y. Wang et al., 2008) suggérant qu'un signal dépendant de la co-stimulation par CD28 contribue aux effets pathogéniques. Il a notamment été montré dans un criblage mutationnel visant à réverser la pathologie LAT que la protéine Rltpr régule cette voie dépendante de CD28 (Liang et al., 2013). En effet, cette protéine de décoiffage de l'actine contrôle la localisation de PKC θ et Carma-1 aux sites d'activation du TCR. De manière concordante avec ces résultats, il a été proposé par d'autres que la pathologie associée à la mutation Y136F serait induites par la dérégulation d'un axe de signalisation Lck-PKC θ induisant une voie Ras/MEK/ERK soutenue. Le KO de la protéine GEF RasGRP1 suffit à bloquer la pathologie (Kortum et al., 2013b).

De nouveaux adaptateurs

Un travail réalisé par le groupe de Lawrence E. Samelson a montré que l'adaptateur Bam32 qui est exprimé dans les lymphocytes T est capable de s'associer à PLC γ 1 et à la sérine protéine kinase PAK1 qui a la capacité d'induire la voie MEK/ERK chez l'homme et la souris (Rouquette-Jazdanian et al., 2012).

Enfin, l'analyse des interactomes de ZAP-70, SLP-76 et LAT dans les lymphocytes T CD4⁺ activés de souris a permis de mettre en évidence l'interaction partagée de ZAP-70 et SLP-76 avec l'adaptateur CD6 (Roncagalli et al., 2014). La phosphorylation de CD6 est dépendante de ZAP-70 qui permet le recrutement de SLP-76 indépendamment de LAT. Cela pourrait contribuer à une signalisation ERK1/2 indépendante de LAT qui a été également rapportée ailleurs dans les dérégulations associées à LAT (Fuller et al., 2012).

L'implication des adaptateurs Bam32 et CD6 dans la pathologie associée à LAT n'a cependant pas été investiguée.

En conclusion, les signalosomes LAT forment un vaste réseau moléculaire impliqué dans l'intégration, la diversification et l'amplification du signal provenant du TCR. L'intégration de l'ensemble de ces paramètres au niveau de ce nœud de signalisation conditionne l'expression génique et une réponse lymphocytaire T tempérée. L'un des enjeux actuels dans le domaine de la signalisation T médiée par

le TCR est de comprendre le rôle des différents modules de signalisation associés à LAT ou indépendant de LAT, leur composition et leur régulation. De plus, bien que de nombreuses études aient porté sur le signalosome LAT et plus généralement la signalisation par le TCR, peu d'étude ont été consacrées à la distribution intracellulaire des acteurs de la signalisation et au rôle de leur localisation dans la signalisation.

1.2.4. La synapse immunologique : une plateforme qui coordonne la signalisation T dans l'espace et dans le temps

Les propriétés de remodelage du cytosquelette des lymphocytes T, ainsi que les molécules d'adhésion et les récepteurs aux chimiokines qu'ils expriment, leur permettent d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus inflammés/infectés/tumoraux. Dans ces sites, la détection d'un antigène lors du « scanning » des cellules environnantes induit l'établissement d'un contact très étroit avec la cellule présentatrice. L'analogie de cette jonction cellulaire particulière, notamment par sa structure, avec les jonctions neuronales a été faite (Dustin and Colman, 2002) et le terme de « synapse » a été proposé dans les années 1980 (Norcross, 1984). Le terme de « synapse immunologique » ou « synapse immune » est aujourd'hui communément utilisé pour décrire les interactions stables établies entre le lymphocytes T et la cellule présentatrice d'antigène. Des interactions multiples rapides et moins stables conduisant à la signalisation des cellules T ont été décrites *in vivo* à l'aide de techniques d'imagerie en bi-photon (H. D. Moreau et al., 2012). Ces « kinapses » ne seront pas décrites ici.

1.2.4.1. Structure spatiale de la synapse immunologique

Les premières descriptions de la structure de la synapse immunologique sont apparues dans les années 90. Elles ont été imagées par microscopie photonique par les groupes de A. Kupfer et M.L. Dustin qui ont utilisé des modèles de lymphocytes T

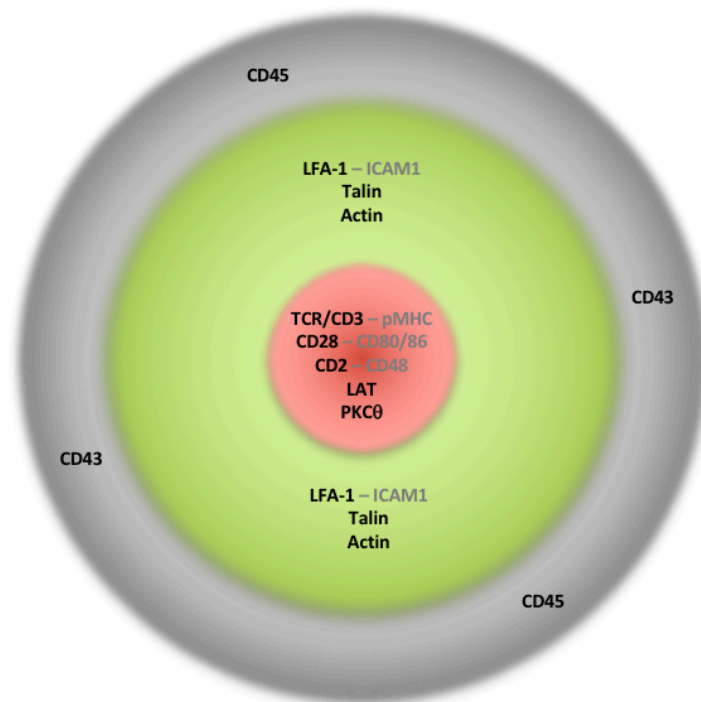


Figure 1.2.6. Organisation de la synapse dite « mature » décrite par A.Kupfer et M. Dustin.

(a) Vue de profil. (b) Vue de face. (a-b) Le « central-SMAC » comprend le TCR, CD28, CD2, LAT et PKCθ (rouge). Le « peripheral-SMAC » présente l'intégrine LFA-1 qui est associée à l'actine par la taline (vert). Le « distal-SMAC » contient les molécules à large ectodomaine comme CD45 et CD43 (gris).

conjugués à des cellules présentatrices d'antigène (lymphocytes B) (Monks et al., 1998; 1997) ou bien en contact avec une bicouche lipidique où le CMH et les molécules participant à l'adhésion (ICAM-1) peuvent diffuser librement (Grakoui et al., 1999).

La synapse immunologique apparaît ainsi organisée de manière concentrique en clusters d'activation supra-moléculaires (SMACs, Supra Molecular Activation Clusters) (**Fig.1.2.6** et **Fig.1.2.7e**). Le SMAC central (cSMAC) est enrichi avec les molécules TCR-CD3, la molécule de costimulation CD28 qui permet le recrutement de PKC θ (Yokosuka et al., 2008), les co-récepteurs CD4 ou CD8 ainsi que la molécule d'adhésion CD2 (Kaizuka et al., 2009). Cette zone est entourée par le pSMAC (SMAC périphérique) enrichie en molécules d'adhésion LFA-1 qui sont liées au cytosquelette d'actine par la taline et dont le ligand est exprimé à la surface de la CPAg est ICAM-1. Le SMAC distale (dSMAC) présente des molécules aux ectodomains volumineux comme CD43 (Sperling et al., 1998) ou les phosphatases CD45 et CD148.

Une des questions majeures qui s'est posée ces 20 dernières années était relative à la mise en place de ce motif synaptique et son rôle dans l'induction de la signalisation induite par le TCR. Il a très tôt été proposé un modèle de ségrégation cinétique (« kinetic segregation ») (S. J. Davis and van der Merwe, 2006) dans lequel les molécules s'organisent à la synapse selon la taille de leur domaine extracellulaire (ectodomaine). Cette ségrégation permettrait l'interaction TCR-pCMH dont la longueur est d'environ 15nm. Ce modèle proposé par le groupe de A. van der Merwe est soutenu par de nombreuses expériences de modifications de longueur des domaines extracellulaires du pCMH (Choudhuri et al., 2005), ou de CD45 (Cordoba et al., 2013). De manière intéressante, la co-localisation forcée du TCR et de la phosphatase à large ectodomaine CD148 inhibe l'activation T (production d'IL-2) suggérant que la ségrégation des molécules à la synapse ne contribue pas seulement à faciliter l'interaction TCR-pCMH mais joue aussi un rôle fonctionnel dans la signalisation. En effet, la fonction des phosphatases conditionne largement l'état de quiescence d'une cellule T. Leur traitement avec des anti-phosphatases comme le pervanadate induit

Pour visionner la vidéo, rendez-vous à cette adresse :

https://www.dropbox.com/s/khntgs9qx5gg4zo/Video_Supplementaire_1_1.mp4?dl=0

Vidéo 1.1. Modèle d'exclusion de CD45 régulant la phosphorylation du TCR (proposé par Chang et al.).

Dans les cellules T au repos, la rencontre aléatoire de la kinase $p56^{\text{Lck}}$ et du TCR peut induire la phosphorylation de celui-ci. Cette phosphorylation est contrebalancée par sa déphosphorylation médiée par la phosphatase CD45, qui régule ainsi l'état basal d'activation du lymphocyte T. Lorsqu'un contact proche est forcé entre un lymphocyte T et une bicouche lipidique par une interaction CD2-CD48, l'ectodomaine de CD45, qui est rigide, induit sa ségrégation à la périphérie de ces contacts et un état de phosphorylation augmenté du TCR (V. T. Chang et al., 2016).

une activation similaire à celle obtenue avec des anticorps activateurs (Roncagalli et al., 2014; Secríst et al., 1993). Notamment, la phosphatase CD45 qui est capable de déphosphoryler les chaînes CD3, joue un rôle important dans la régulation de la signalisation T (Schoenborn et al., 2011). Très récemment, il a été démontré par des analyses de structure que CD45 présente un ectodomaine rigide qui induit sa ségrégation spontanée vers la périphérie lorsque les cellules T établissent un « contact proche » avec un substrat (V. T. Chang et al., 2016). *In vitro*, l'interaction de la molécule d'adhésion CD2 avec son ligand CD48 présente une longueur similaire au TCR-pCMH et contribuerait à établir ces contacts proches. Bien plus encore, l'induction de telles zones de contact induirait la phosphorylation du TCR et le recrutement de ZAP70 même en absence d'antigène. Dans le modèle proposé ici, en absence de contact cellulaire proche, la phosphorylation du TCR par $p56^{Lck}$, qui est constitutivement active (Nika et al., 2010), est contrebalancée par l'activité phosphatase de CD45. Lors d'un contact proche médié par CD2/CD48, CD45 (ainsi que d'autres phosphatases à large ectodomaine) seraient spontanément ségrégées. Elles n'exerceraient alors plus leur action de déphosphorylation du TCR, ce qui induirait l'initiation d'une activation (**vidéo 1.1**). Ce modèle contribue à la compréhension de l'initiation de la signalisation et est en accord avec le fait qu'environ 40% de la fraction totale de $p56^{Lck}$ soit présente sous forme active. Cependant, il paraît primordiale que ces contacts proches soient étroitement régulés *in vivo* afin d'éviter des activations indépendantes de l'antigène. Il peut toutefois être envisagé que ce mécanisme joue un rôle dans l'induction d'un signal tonique nécessaire à la survie des cellules en périphérie mais ne dépassant pas le seuil d'activation nécessaire à une réponse T.

1.2.4.2. Formation des microclusters de signalisation ou la coordination de la signalisation dans le temps

En dehors de l'exclusion des molécules encombrantes et des phosphatases, le rôle de la structure concentrique de la synapse dans la signalisation T a longtemps été

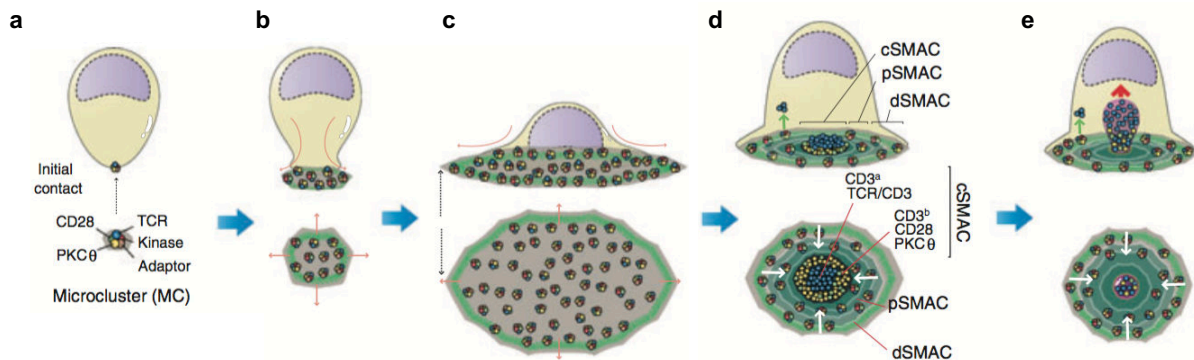


Figure 1.2.7. Etapes successives de formation de la synapse immunologique avec une CPAg ou bien une bicouche lipidique.

(a) Au premier contact avec le pMHC, une signalisation est induite très rapidement par un nombre limité de TCR et de molécules de signalisation. (b-c) Le lymphocyte s'étale sur la surface antigénique et des microclusters de signalisation sont visibles par microscopie. (d) Les microclusters de signalisation se déplacent en suivant un flux d'actine centripète, et s'accumulent au centre de la synapse. (e) Le centre de la synapse fait l'objet d'une endocytose importante des microclusters de signalisation pour des peptides antigéniques de forte affinité. Cela est associé à la terminaison du signal par dégradation des microclusters de TCR (Alarcón et al., 2011).

Pour visionner la vidéo, rendez-vous à cette adresse :

https://www.dropbox.com/s/8qeinsa10zxa7zc/Video_Supplementaire_1_2.mp4?dl=0

Vidéo 1.2. Flux d'actine centripète à la synapse immunologique.

Des lymphocytes T humains exprimant le peptide Lifeact étiqueté avec la GFP et marquant l'actine polymérisée. Les lymphocytes ont été étalés sur un substrat recouvert d'anticorps anti-CD3 et d'ICAM-1 (Comrie et al., 2015a).

débatue (Alarcón et al., 2011; Dustin and Depoil, 2011). Les observations de la mise en place de la synapse dans le temps ont très largement contribué à la compréhension de sa fonction. En effet, l'analyse des formes phosphorylées des molécules de signalisation a montré que la signalisation précède la mise en place d'une synapse immunologique concentrique (synapse « mature ») (K.-H. Lee et al., 2002) et débute au premier contact avec une surface activatrice induisant dès les premières secondes (5 secondes) une signalisation calcique (Bunnell et al., 2002). Des agrégats de molécules de signalisation (TCR, p56^{Lck}, ZAP-70, LAT, Grb2, GADS, SLP-76) se forment très rapidement à cette zone de contact (**Fig.1.2.7a**). Ces « microclusters » sont enrichis en molécules phosphorylées sur leur tyrosine (Barda-Saad et al., 2005). Un recrutement dépendant de la forme phosphorylée de LAT, des molécules Vav1, Nck et Wasp qui mettent en jeu la machinerie de polymérisation de l'actine (Arp2/3) est aussi observé. Le remaniement du cytosquelette d'actine permet l'étalement du lymphocyte (20 à 60 secondes) qui est propice à son observation par microscopie (**Fig.1.2.7b-c**). Les microclusters de TCR associés au pCMH migrent alors de la périphérie vers le centre et il s'établit peu à peu une structure concentrique caractéristique (4 à 5 minutes) tandis que les microclusters de p56^{Lck}, ZAP-70 et LAT perdurent plus longtemps en périphérie (Campi et al., 2005) (**Fig.1.2.7d**). L'utilisation de la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) ou microscopie à onde évanescente a permis de mieux caractériser la synapse immunologique en augmentant la sensibilité de l'observation sur une tranche de 120 à 150nm d'épaisseur évitant ainsi les interférences avec les signaux hors focus. Ainsi, il a été observé que, tandis que les microclusters de TCR s'accumulent au centre de la synapse, de nouveaux microclusters TCR/ZAP-70/SLP-76, difficiles à détecter par microscopie classique, se forment à la périphérie jusqu'à 30 minutes après le premier contact TCR-pCMH et migrent vers le centre à leur tour (Campi et al., 2005; Yokosuka et al., 2005). Le traitement des cellules avec de la latrunculine-A, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, a montré que le mouvement de la périphérie vers le centre de la synapse est dépendant d'un flux d'actine centripète au niveau du pSMAC (Campi et al., 2005; Kaizuka et al., 2007; Varma et al., 2006) (**vidéo 1.2**). Cependant, la phosphorylation

des protéines au cSMAC est faible, voire inexistante alors que les microclusters situés en périphérie sont compétents pour signaler (Campi et al., 2005; K.-H. Lee et al., 2002; Yokosuka et al., 2005). Ces observations suggèrent donc que la signalisation survient et est entretenue au pSMAC pendant que la signalisation des microclusters TCR anciennement formés se termine au cSMAC. L'idée que la structure en zone concentrique de la synapse permet la régulation négative de la signalisation a alors été avancée. La présence de marqueurs de corps multivésiculaires (MVB, « multivesicular bodies ») qui sont des compartiments dédiés en autres à la dégradation de cargos, est enrichie au cSMAC (Varma et al., 2006) et suggère que le cSMAC soit un puits d'endocytose dédié à la terminaison du signal TCR. Cette hypothèse a été confirmée par le groupe de Balbino Alarcon qui a démontré que le cSMAC présentent des évènements endocytiques comparable à une phagocytose frustrée (Martínez-Martín et al., 2011) (**Fig. 1.2.7e**). Cette endocytose est induite par TC21 qui est impliqué dans la voie PI3-Kinase nécessaire à l'activité d'endocytose RhoG-dépendante. Par ailleurs, il a été rapporté que la protéine CD2AP (CD2-Associated Protein) régulerait la terminaison du signal au cSMAC (K.-H. Lee et al., 2003). En effet, en absence de ce partenaire de CD2, la prolifération des lymphocytes T est augmentée et cette dérégulation est associée à une augmentation de la phosphorylation au cSMAC. CD2AP peut se lier à l'ubiquitine ligase E3 c-Cbl (Kirsch et al., 2001), suggérant que la modulation négative de la signalisation par le TCR au cSMAC est régulée par polyubiquitination. Les travaux de l'équipe de Michael Dustin sur le rôle de la machinerie ESCRT, qui reconnaît les protéines ubiquitinylés et permet leur ciblage dans des compartiments de dégradation confirment cette hypothèse (Vardhana et al., 2010). Ainsi, en absence d'une machinerie ESCRT-I opérationnelle (TSG101 knock-down par RNAi), une large accumulation de microclusters TCR ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation à la synapse sont observées. Les défauts de la structure de la synapse en absence de TSG101 induisent ainsi la perdurance des signaux calciques et de production d'IL-2 après activation des lymphocytes T. Ces observations suggèrent que la synapse, et notamment le cSMAC, régule la terminaison de la signalisation.

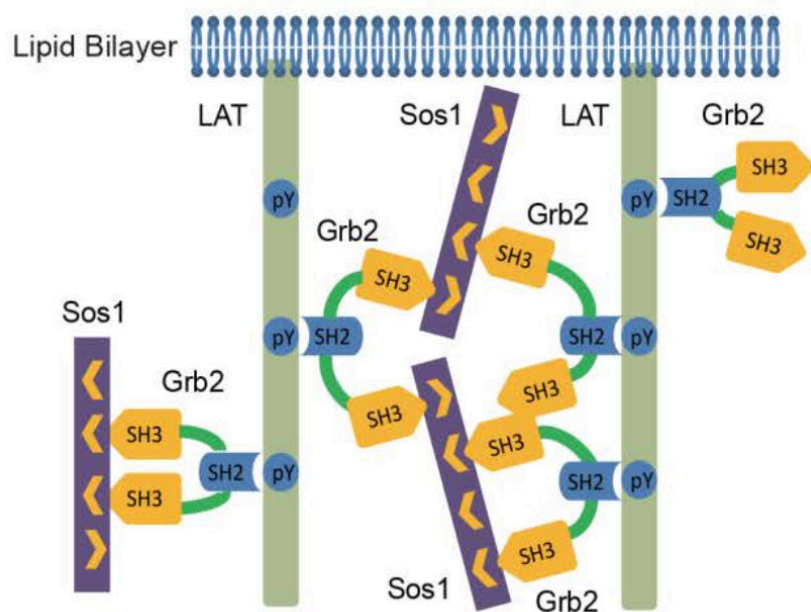


Figure 1.2.8. Illustration de la fonction de Sos dans l'oligomérisation de LAT.

Plusieurs protéines adaptatrices Grb2 se lient à LAT via leur domaine SH2 et peuvent interagir avec plusieurs molécules Sos par leurs domaines SH3 induisant l'oligomérisation des signalosomes LAT (Su et al., 2016).

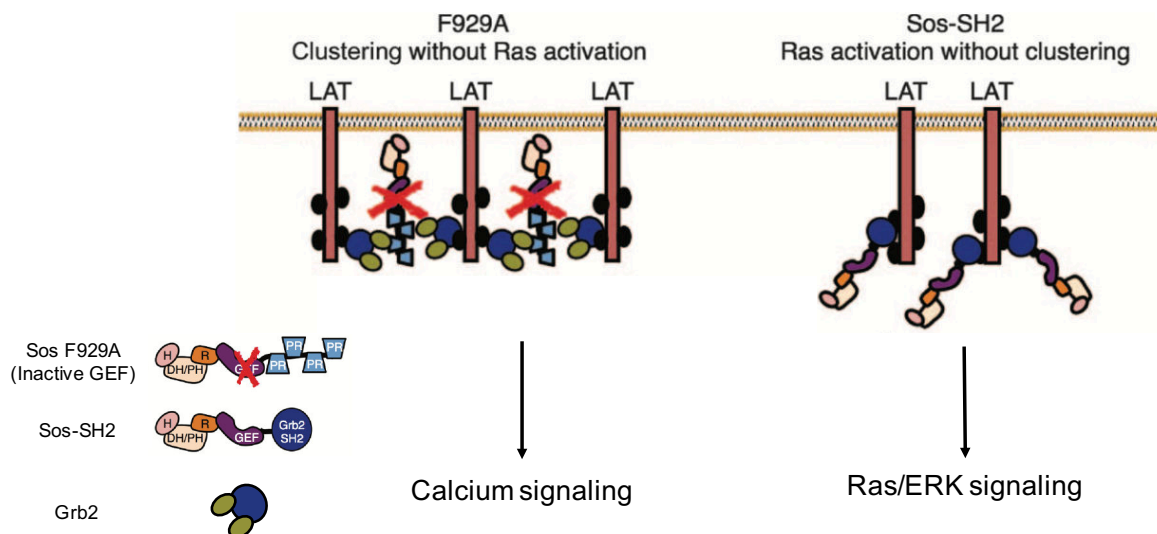


Figure 1.2.9. Modèle proposé par le groupe de L.E. Samelson sur la fonction de Sos dans l'oligomérisation de LAT lors de l'engagement du TCR.

L'expression d'un mutant Sos (F929A, fonction GEF inactive) inhibe la signalisation dépendante de Ras, mais est toujours capable d'oligomériser LAT par la liaison de plusieurs molécules Grb2 à son domaine PRR. L'expression d'une forme modifiée de Sos associée au domaine SH2 de Grb2 et ne possédant pas de domaine PRR (Sos-SH2) permet la liaison directe d'une molécule Sos avec une molécule de LAT. Dans ce cas, l'oligomérisation de LAT est inhibée et la signalisation calcique diminuée alors que la signalisation Ras/ERK est maintenue. Ce modèle montre ainsi l'importance de Sos et de l'oligomérisation de LAT dans la signalisation lymphocytaire T. Travail réalisé dans des thymocytes (Kortum et al., 2013a).

Plus récemment, le groupe de Kentner Singleton et Christoph Wülfing s'est attaché à comprendre la structure de la synapse à plus large échelle (Singleton et al., 2011; 2009). En effet, l'observation dans le temps d'une trentaine de senseurs de signalisation dans les lymphocytes T de souris interagissant avec des CPAg a permis de déterminer des motifs de recrutement. Ces motifs sont différents d'un senseur à l'autre, mais surtout variables pour une même molécule. Ainsi, pour un même senseur six patterns ont pu être définis avec toutefois des localisations préférentielles selon le senseur (central, invaginal, périphérique, diffus, lamellaire, ou distal). Par exemple pour le senseur relatif à LAT, environ 70% des conjugués présentent un recrutement central des molécules qui perdurent dans le temps tandis que 30% des conjugués ont une localisation diffuse de LAT à la synapse. Cette approche a ainsi apporté une base de données intéressantes pour la compréhension de la structure spatio-temporelle de la synapse.

1.2.4.3. Les microclusters LAT

La formation de microclusters de LAT est également observée au cours de l'activation (Houtman et al., 2006). La formation de ces microclusters dépend de la phosphorylation des résidus tyrosine associés à LAT ainsi que de son association à Sos1, une protéine d'échange GDP/GTP de la protéine Ras, qui contient une région riche en proline. Cette région est capable de se lier à plusieurs molécules Grb2 pour induire l'oligomérisation des signalosomes LAT visibles en microscopie confocale (Bilal and Houtman, 2015; Kortum et al., 2013a) (**Fig.1.2.8**). De manière intéressante, un mutant de Sos1 capable de se fixer à LAT mais présentant une région riche en proline altérée inhibant l'oligomérisation de LAT impacte la signalisation calcique mais pas celle de la voie Ras/MAPKinase (Kortum et al., 2013a) (**Fig.1.2.9**). Cela suggère que la présence des tyrosines phosphorylées sur LAT ne suffit pas à elle seule pour transduire de manière appropriée le signal issu du TCR mais que la transduction du signal par LAT nécessite également la nucléation des microclusters dépendante de

Sos1 et Grb2. Il est ainsi probable que la formation de ces microclusters soit nécessaire à la stabilisation des complexes de signalisation. La formation de tels clusters a été reconstituée artificiellement dans des membranes avec des protéines purifiées (W. Y. C. Huang et al., 2016; Su et al., 2016). Notamment, le groupe de Ronald Vale a introduit des molécules purifiées phospho-LAT dans des membranes et a montré que ces molécules se regroupent par séparation de phase après l'ajout de Sos1 et Grb2 dans le milieu (Su et al., 2016). De plus, en jouant avec la présence ou l'absence de Sos1 et donc la nucléation de microclusters ou non, il a démontré que la phosphatase CD45 est spontanément exclue des microclusters. Cette exclusion dépendante de la formation des microclusters est probablement attribuable aux exclusions de charges des protéines, les clusters étant globalement chargés positivement. Cette exclusion dépendante de la formation des microclusters contribue ainsi à protéger LAT de la déphosphorylation par CD45.

1.2.4.4. Fonctions associées à la synapse immunologique

Microclusters & soutien du signal

Le rôle des microclusters dans la signalisation reste encore mal compris. Il a été mis en évidence par le groupe de M.M Davis qu'une grande majorité des molécules à la membrane plasmique sont présentes sous forme de nanodomains pré-existants (Lillemeier et al., 2006). Notamment, le TCR existe sous forme monovalente et multivalente (nanocluster). Des analyses en biochimie menées par le laboratoire de Balbino Alarcon ont démontré qu'en réponse à de faibles doses d'antigène les nanoclusters de TCR sont plus phosphorylés que les formes monovalentes (Schamel et al., 2005). Les clusters de TCR permettraient ainsi d'augmenter l'avidité des interactions pCMH-TCR augmentant la sensibilité du TCR à des antigènes de faible affinité. Notamment, la compétition par l'ajout d'anticorps anti-CMH ne parvient pas à rompre les microclusters TCR ((Varma et al., 2006) soulignant que les microclusters formés à la zone synaptique sont des sites de haute avidité pour le pCMH.

Adaptation de la signalisation à l'antigène : le cSMAC balance entre soutien et terminaison du signal

La plupart des analyses de la synapse immunologique sont réalisées avec des lymphocytes T exprimant un TCR transgénique sélectionné pour reconnaître un peptide antigénique avec une affinité relativement forte qui n'est pas nécessairement représentatif des conditions physiologiques (Mandl et al., 2013). De manière intéressante, il a été montré que l'utilisation de faibles concentrations de peptides ou de peptides mutés de plus faibles affinités pour le TCR augmente la quantité de protéine phosphorylée au cSMAC et une diminution de la dégradation des microclusters (Cemerski et al., 2008). Cette diminution est corrélée à une diminution du recrutement de TSG101 au cSMAC (Vardhana et al., 2010). Enfin, lorsque la formation du cSMAC est forcée en présence de peptides de forte affinité, la prolifération est diminuée en comparaison à une synapse formée normalement. A l'inverse, en présence d'un peptide de faible affinité, la formation forcée du cSMAC maintient voire augmente légèrement la prolifération T par rapport à une synapse formée normalement (Cemerski et al., 2008). Cela suggère que la synapse jouerait un rôle de rhéostat qui contrôle la réponse T en adaptant la fonction du cSMAC entre soutien et terminaison du signal selon la qualité de l'antigène.

Différenciation lymphocytaire T

La formation de la synapse immunologique induit une distribution asymétrique de nombreuses molécules, qui sont enrichies à la synapse. Il a été proposé que cela conduise à une division asymétrique des lymphocytes T formant une synapse, la cellule interagissant avec la CPAg contenant plus de molécules de signalisation que celle générée à l'autre pôle. De telles divisions asymétriques ont été observées *in vivo* et conditionneraient précocement le destin effecteur ou mémoire des lymphocytes T (J. T. Chang et al., 2007). Certains proposent par ailleurs que la géométrie de la synapse serait impliquée dans ces événements de divisions asymétriques (Jung et al., 2014). Cependant ce modèle est critiqué et d'autres modèles proposent que la différenciation intervient plus tardivement à partir de cellules effectrices.

Le groupe de Ronald Germain a récemment montré que la qualité de l'antigène contribue à la différenciation Thelper (Th1 versus Th2) (van Panhuys et al., 2014). Or, un certain nombre de preuve pointe la synapse comme un modulateur de la signalisation dépendant de l'affinité de l'antigène. Il peut donc être envisagé que la qualité d'une synapse immunologique puisse réguler ces choix de différenciation lymphocytaire T vers des effecteurs Th1 ou Th2. Par ailleurs, il a été rapporté que le recrutement préférentiel du récepteur à l'IL-4 ou du récepteur à l'IFN- γ à la synapse immunologique contrôle la différenciation T-helper (Maldonado et al., 2004; 2009).

La synapse une zone de sécrétion focalisée

La cytotoxicité induite par les cellules T cytotoxiques (CTL) à l'encontre des cellules tumorales ou infectées met en jeu des événements de sécrétion de cargos appelés granules cytolytiques contenant des molécules cytotoxiques (perforine/granzyme). L'étude de la synapse établie entre des CTL et des cellules cibles a montré que la zone centrale de la synapse contient le cSMAC ainsi qu'une zone privilégiée de sécrétion des granules (Stinchcombe et al., 2001b). Il a été proposé que le pSMAC, qui entoure ce domaine de sécrétion, permettrait de sceller la zone de dégranulation grâce aux interactions LFA-1/ICAM-1 et éviterait ainsi une fuite de molécules cytotoxiques (Kaizuka et al., 2007; D. Liu et al., 2009). Cela éviterait « les dommages colatéraux » par lyse des cellules proches mais n'interagissant pas directement avec la CPAg.

Dans les lymphocytes T CD4⁺, la sécrétion polarisée de cytokines comme l'IL-2 et l'IFN- γ à la synapse immunologique a été décrite (Kupfer et al., 1991) et serait régulée activement par l'exclusion de l'actine au centre de la synapse (Chemin et al., 2012). Dans la mesure où la sécrétion de cytokines permet d'établir une communication entre des cellules distantes, le rôle de la sécrétion polarisée à la synapse reste encore mal compris. Il a toutefois été proposé par Morgan Huse et Mark Davis que la polarisation de la synapse n'affecte pas la sécrétion de toutes les

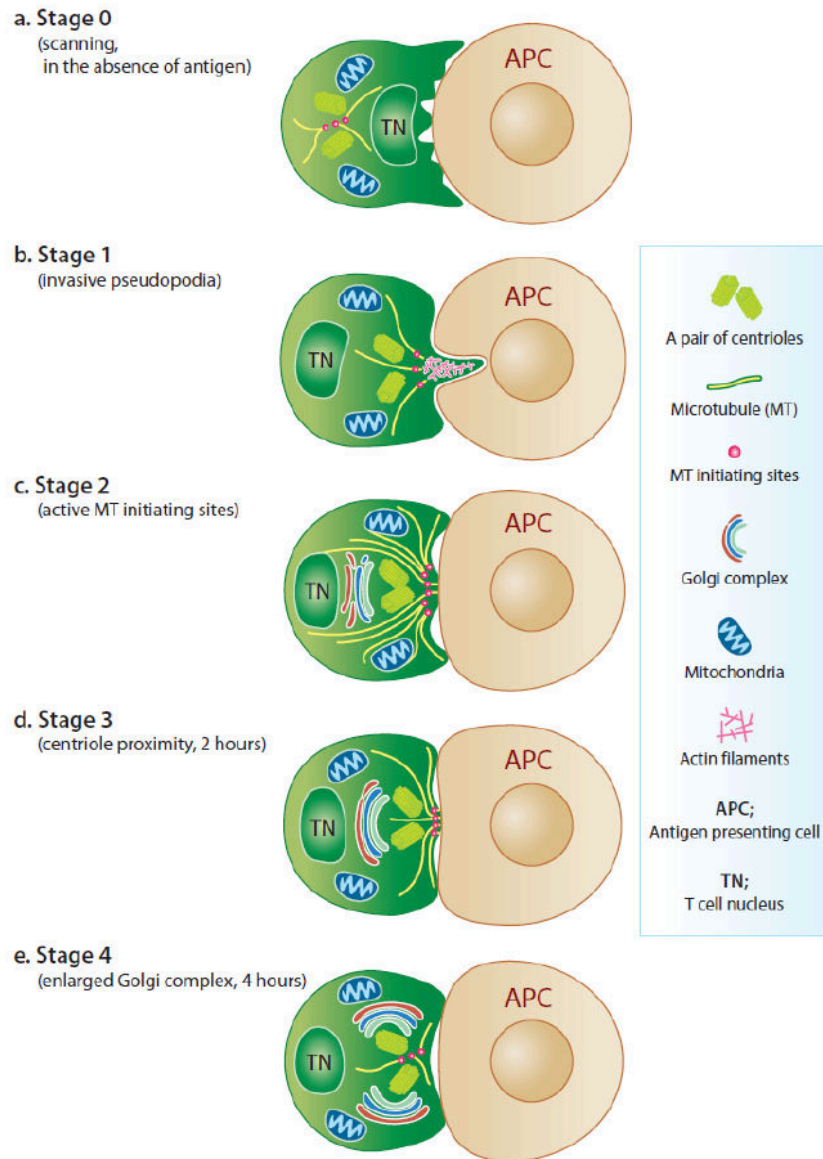


Figure 1.2.10. Remaniements intracellulaires d'un lymphocyte T CD4⁺ formant une synapse avec une CPAg (APC).

Le stade 0 correspond à l'étape de « scanning » du lymphocyte à la surface de la CPAg et est caractérisé par la présence de pseudopodes. Lorsque que le contact pCMH-TCR est établi (stade 1), le lymphocyte T forme un contact étroit avec la CPAg, notamment caractérisé par des pseudopodes qui entrent profondément dans la CPAg sans rupture de la membrane plasmique de celle-ci. Au stade 2, l'appareil de Golgi et les centrioles sont très proches de la synapse, et la polymérisation des microtubules est très active. Au stade 3, les centrioles sont toujours très proches de la membrane plasmique, et les microtubules longent la synapse. Au stade 4, le centrosome est détaché de la zone de contact et se retrouve entouré par les saccules de l'appareil de Golgi qui augmentent en taille, signant une activité de synthèse protéique importante. Interprétations tirées d'analyses de synapses établies entre des lymphocytes T CD4⁺ de souris et différentes CPAg par microscopie électronique à transmission couplée à la tomographie en 3-dimensions (Ueda et al., 2011).

cytokines, certaines étant ciblées vers la CPAg (IL-2 et IFN- γ) tandis que d'autres sont sécrétées de façon multidirectionnelle (TNF- α et IL-4) (Huse et al., 2006). Il faut également noter qu'une étude *in vivo* réalisée par le groupe de P. Bousso a mis en évidence une sécrétion d'IFN γ en absence de formation de synapse immunologique (Müller et al., 2012) permettant la mise en place d'une réponse systémique même lorsque peu de cellules sont infectées par un pathogène.

1.2.4.5. Remaniements généraux du lymphocyte T en contact avec une CPAg

Les microclusters de signalisation sont mis en jeu à la surface de contact entre la cellule T et le substrat activateurs (cellules présentatrices ou substrats artificiels). Cependant, sous la membrane plasmique, des changements profonds au sein de la cellule sont induits lors de l'établissement d'une synapse immunologique. Une étude d'intérêt menée par le groupe de Mark. M. Davis a analysé l'établissement d'une synapse et le remaniement interne qui l'accompagne dans des lymphocytes T CD4⁺ de souris conjugués avec différentes CPAg (Ueda et al., 2011). Les observations ont été réalisées à différents temps par microscopie électronique à transmission couplée à la tomographie en 3-dimensions apportant une très haute résolution dans l'analyse des structures cellulaires.

En absence d'antigène, les cellules T présentent des contacts parcellaires sous la forme de pseudopodes avec les CPAg. Ces contacts représentent la phase de scanning de la CPAg (**Fig.1.2.10a**). Au sein de la cellule T, le centrosome n'est pas polarisé vers la zone de contact avec la CPAg et est entouré par des vésicules et les saccules de l'appareil de Golgi. En présence d'antigène, quatre stades sont décrits. A environ 30 minutes de conjugaison, une polarisation des centrioles vers la zone de contact est observée. Des invaginations pénétrant profondément dans la CPAg se forment (**Fig.1.2.10b**). Ils sont dépourvus de compartiments vésiculaires ou de microtubules et seraient principalement dues à la polymérisation d'actine. Il est proposé que ces pseudopodes invasifs permettent d'augmenter la surface de contact

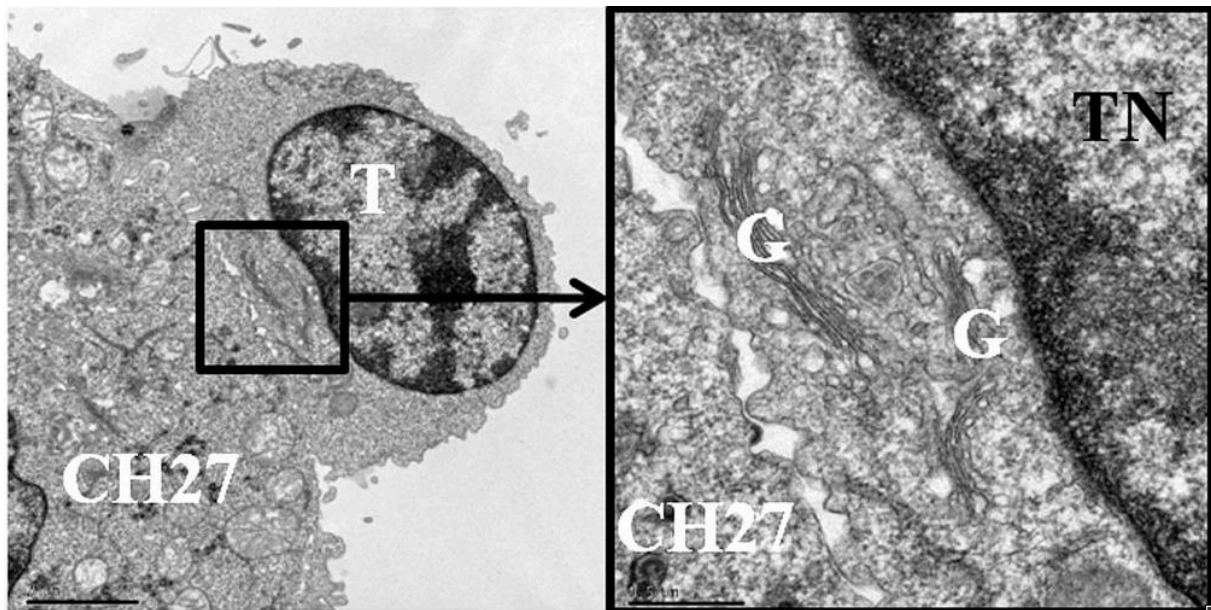


Figure 1.2.11. Images par microscopie électronique à transmission d'un lymphocyte T CD4⁺ établissant une synapse.

Cette représentation montre une distance très réduite entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique de la synapse. T, lymphocyte T ; CH27, CPAg ; G, appareil de Golgi ; N, noyau (Ueda et al., 2011).

avec la cellule présentatrice pour augmenter l'interaction TCR-pCMH mais il est aussi envisageable que cela contribue à exclure les molécules encombrantes comme CD45. De telles forces de poussée dépendantes de l'actine ont par ailleurs été décrites dans un système de présentation sur billes recouvertes d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 (Husson et al., 2011). Dans ce contexte, la protrusion est modulée par la rigidité de la surface présentatrice suggérant que le lymphocyte T CD4⁺ est capable de percevoir la rigidité de la CPAg et éventuellement d'adapter ses voies de signalisation aux propriétés physiques du substrat. Par ailleurs, ces pseudopodes invasifs ont aussi été observés aux synapses formées par les cellules T CD8⁺ cytotoxiques et les cellules NK avec leurs cibles (Sanderson and Glauert, 1979). Il est proposé aujourd'hui que les forces développées par les cellules cytotoxiques à la synapse immunologique induisent une tension de membrane dans les cellules cibles favorisant l'entrée de la perforine dans la membrane et leur lyse (Basu et al., 2016). Les protrusions observées par le groupe de M.M.Davis pourraient exercer de telles tensions dans ce contexte et contribuer à la fonction effectrice des CTLs. Il serait intéressant d'étudier ce que ces forces induisent dans les lymphocytes T CD4⁺.

Au second stade, les centrioles sont proches de la zone de contact où la polymérisation de microtubules est très active (**Fig.1.2.10c**). De manière intéressante, l'extrémité des microtubules est ancrée au centre de la synapse mais aussi à différents organelles et vésicules. Entre le centrosome et la synapse, de nombreux endosomes sont observés signant un trafic intracellulaire très actif. Le troisième stade, qui correspondrait à une synapse établie, présente une activité vésiculaire moins intense. Le centrosome est ancré à la membrane par des « fibres denses aux électrons » et les microtubules longent la surface de contact avec la CPAg (**Fig.1.2.10d**). Par ailleurs, les saccules de Golgi sont en arrière du centrosome mais restent très proches de la synapse (Fig.1.2.11). Enfin, après 4 heures de conjugaison (stade 4), le centrosome est détaché de la zone de contact et se retrouve entouré par les saccules de l'appareil de Golgi qui augmentent en taille, témoignant d'une activité de synthèse protéique (**Fig.1.2.10e**).

Ainsi, un remaniement interne profond du lymphocyte T s'opère au cours de son activation. Ces modifications sont notamment marquées par l'engagement du centrosome, qui est en relation très proche avec l'appareil de Golgi, et la polymérisation active de microtubules. Le trafic vésiculaire est également intense lors de l'établissement de la synapse. Cela peut suggérer que des événements sous-membranaires de signalisation peuvent contribuer à la synapse immunologique et l'activation T.

1.3. Le trafic intracellulaire et la signalisation lymphocytaire T

Plusieurs groupes ont rapporté que le recrutement des molécules de signalisation à la synapse immunologique ainsi que la signalisation induite par le TCR n'a lieu qu'à la membrane plasmique. Ces études affirment notamment que le recrutement des molécules de signalisation par diffusion latérale à la membrane plasmique serait suffisant (Balagopalan et al., 2013; Douglass and Vale, 2005; Favier et al., 2001; Lillemeier et al., 2010; Sherman et al., 2011; Wulfiging and M. M. Davis, 1998). Cependant, comme je l'ai souligné par la description des travaux de Mark M. Davis (Ueda et al., 2011) (**Partie 1.2.4.5**), les techniques d'observation et notamment la résolution en microscopie ont été largement améliorées au cours des années. L'association de ces techniques à l'étude des voies de transport intracellulaire des molécules de signalisation a permis de mettre en évidence une organisation spatiale plus complexe de la signalisation, qui met en jeu différents compartiments dont des compartiments vésiculaires (Benzing et al., 2013; Cebecauer et al., 2012; Lou et al., 2016; Rossy et al., 2013b).

Je m'attacherai ainsi dans cette partie à décrire les mécanismes mis en œuvre dans le transport membranaire au cours de l'activation. Je commencerai par donner un aperçu du fonctionnement des petites GTPases Rab qui coordonne le trafic intracellulaire. La réorientation du MTOC constitue un événement important dans la mise en place des conditions nécessaires au transport intracellulaire et j'en décrirai donc quelques aspects. Je décrirai ensuite les principaux acteurs du transport intracellulaire mis en jeu dans les lymphocytes T.

1.3.1. Aperçu du fonctionnement des petites GTPases Rab

Les petites GTPases Rab constituent des acteurs majeurs dans l'orchestration du trafic intracellulaire. Elles représentent chez l'homme une famille comptant plus d'une soixantaine de membres. Dans cette partie d'introduction relative au transport intracellulaire dans les lymphocytes T, je parlerai de différentes petites GTPases Rab présentes dans divers compartiments sub-cellulaires et, d'une manière générale, d'un

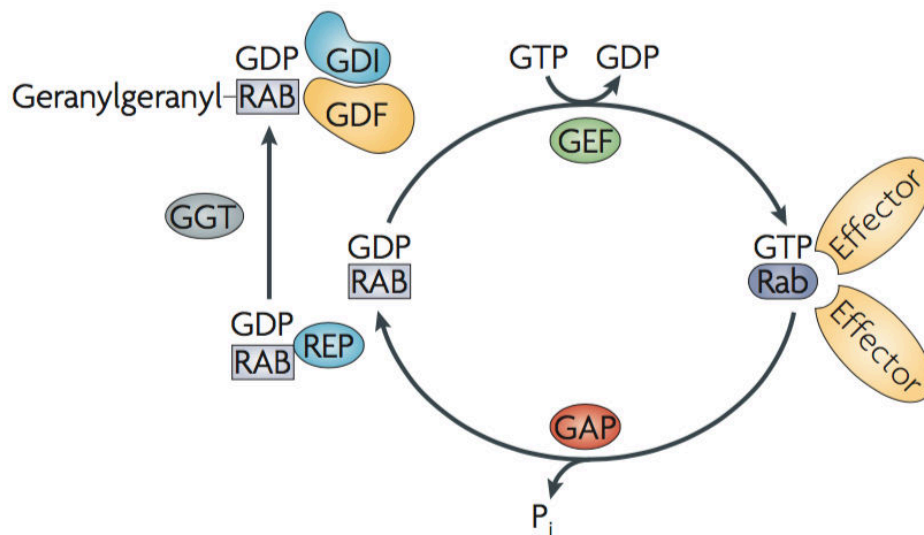


Figure 1.3.1. Cycle d'activation des petites GTPases Rab.

Les petites GTPases liées au GDP sont inactives. Les protéines GEF assurent l'échange GDP/GTP et activent la Rab qui est alors liée au GTP. Cette forme est dite « active » car elle est capable de recruter un certain nombre d'effecteurs impliqués dans le trafic intracellulaire. Les protéines GAP assurent l'hydrolyse du GTP, et inactivent donc la petite GTPase Rab. La protéine Rab néosynthétisée est chaperonnée par les protéines REP qui la présentent à l'enzyme Géranyl-Géranyl transférase (GGT) assurant sa géranyl-géranylation nécessaire à son ancrage dans les membranes. Les protéines Rab GDP dissociation inhibitors (GDI) jouent également une fonction de chaperonne stabilisant la forme Rab-GDP cytosolique. L'association de cette forme stabilisée avec les GDI-displacement factor (GDF) induirait le ciblage spécifique de petites GTPases aux membranes des compartiments appropriés (Stenmark, 2009).

certain nombre de protéines dont les fonctions dépendent de ces petites GTPases. Je m'emploierai donc ici à donner une vue générale sur le fonctionnement des protéines Rab, les différents compartiments qu'elles régulent, ainsi que les principaux effecteurs liés aux protéines Rab et impliqués dans le transport intracellulaire.

1.3.1.1. Cycle d'une petite GTPase Rab

L'activité des petites GTPase Rab est conditionnée par un cycle d'activation/inactivation (**Fig.1.3.1**) (Stenmark, 2009). En effet, lorsque les petites GTPases sont liées au GDP, elles sont dans la plupart des cas inactives alors que la forme GTP est dite « active ». La forme active des petites GTPases Rab est capable de recruter différents effecteurs cruciaux de la régulation du transport intracellulaire, et dont je citerai quelques exemples en **partie 1.3.1.3**. Le passage d'une forme liée au GDP à une forme liée au GTP dépend de facteurs d'échange GEFs (« guanine nucleotide exchange factor ») qui facilitent la libération du GDP. L'activité GTPase des protéines Rab est très faible et le passage de la forme active à la forme inactive dépend également de facteurs externes GAPs (« GTPase activating protein »). Diverses GAPs et GEFs ont été mises en évidence et ont une certaine spécificité pour les protéines Rab qu'elles activent ou inactivent.

D'autres facteurs contribuent largement à l'activité des protéines Rab et permettent notamment le recyclage entre le cytosol et les membranes. Cette fonction est assurée par des protéines jouant des fonctions de chaperonnes. Notamment, la protéine GDI (« Rab GDP dissociation inhibitor »), non seulement stabilise les formes Rab-GDP, mais assure aussi leur ciblage aux membranes appropriées grâce à leur interaction avec les facteurs GDF (« membrane-bound GDI displacement factor »). Un autre facteur non moins important jouant une fonction de chaperonne est la protéine REP (« Rab Escort Protein »). Ce facteur prend en charge les protéines Rab

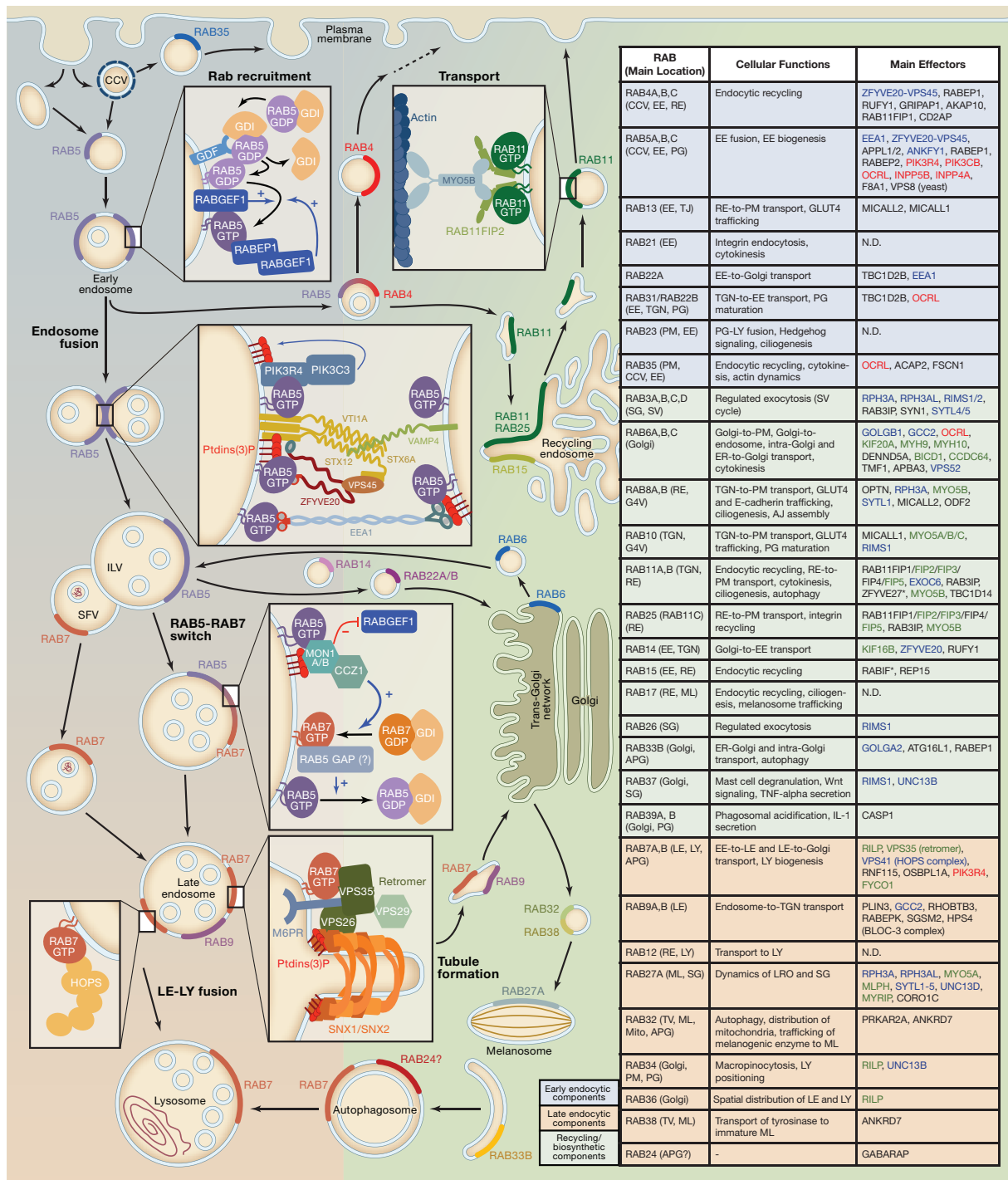


Figure 1.3.2. Les petites GTPases Rab sont localisées au niveau de différents compartiments intracellulaires où elles jouent diverses fonctions : exemples du trafic intracellulaire endocytique (Galvez et al., 2012).

néosynthétisées, les présente aux enzymes GGT (geranyl-geranyl transférase) qui induisent l'isoprénylation (géranyl-géranylation) nécessaire à leur stabilisation par le facteur GDI et leur association aux membranes.

1.3.1.2. Protéines Rab et identité membranaire

La capacité des protéines Rab à réguler une multitude de voies de transport intracellulaire provient de leur capacité à être ciblées aux compartiments intracellulaires appropriés et de recruter les effecteurs membranaires adéquats (**Fig.1.3.2**) (Galvez et al., 2012). Ainsi, les protéines Rab sont souvent utilisées comme des marqueurs des compartiments intracellulaires employés pour analyser la localisation de protéines d'intérêt. Au niveau de ces compartiments, les protéines Rab coordonnent le transport des différents cargos. Par exemple, Rab6, dont je décrirai les fonctions connues dans la **partie 1.3.5**, est présente au niveau de l'appareil de Golgi et coordonne plusieurs types de transport depuis ce compartiment (voie de sécrétion et voies de recyclage). Rab8 est également associée à des voies de sécrétion antérogrades depuis le réseau trans-Golgi (TGN) vers la périphérie cellulaire. Les voies de sécrétion constitutives vers la membrane plasmique sont contrebalancées par des voies endocytiques des cargos. Ces cargos sont en effet internalisés dans différents types de vésicules entourées par des manteaux de clathrine comme le TfR (Motley et al., 2003) ou de manière indépendante de la clathrine comme le récepteur à l'IL-2 (sous-unité β) (Basquin et al., 2013; 2015; Grassart et al., 2008) . D'une manière plus générale, Rab5 est située au niveau des endosomes précoces, ou endosomes de tri. Cette petite GTPase effectue différentes fonctions allant du déshabillage des vésicules de clathrine à la fusion endosome-endosome. Depuis ces endosomes de tri, les cargos peuvent suivre une voie rapide de recyclage vers la membrane plasmique par des compartiments Rab4⁺ ou bien, une voie plus longue par

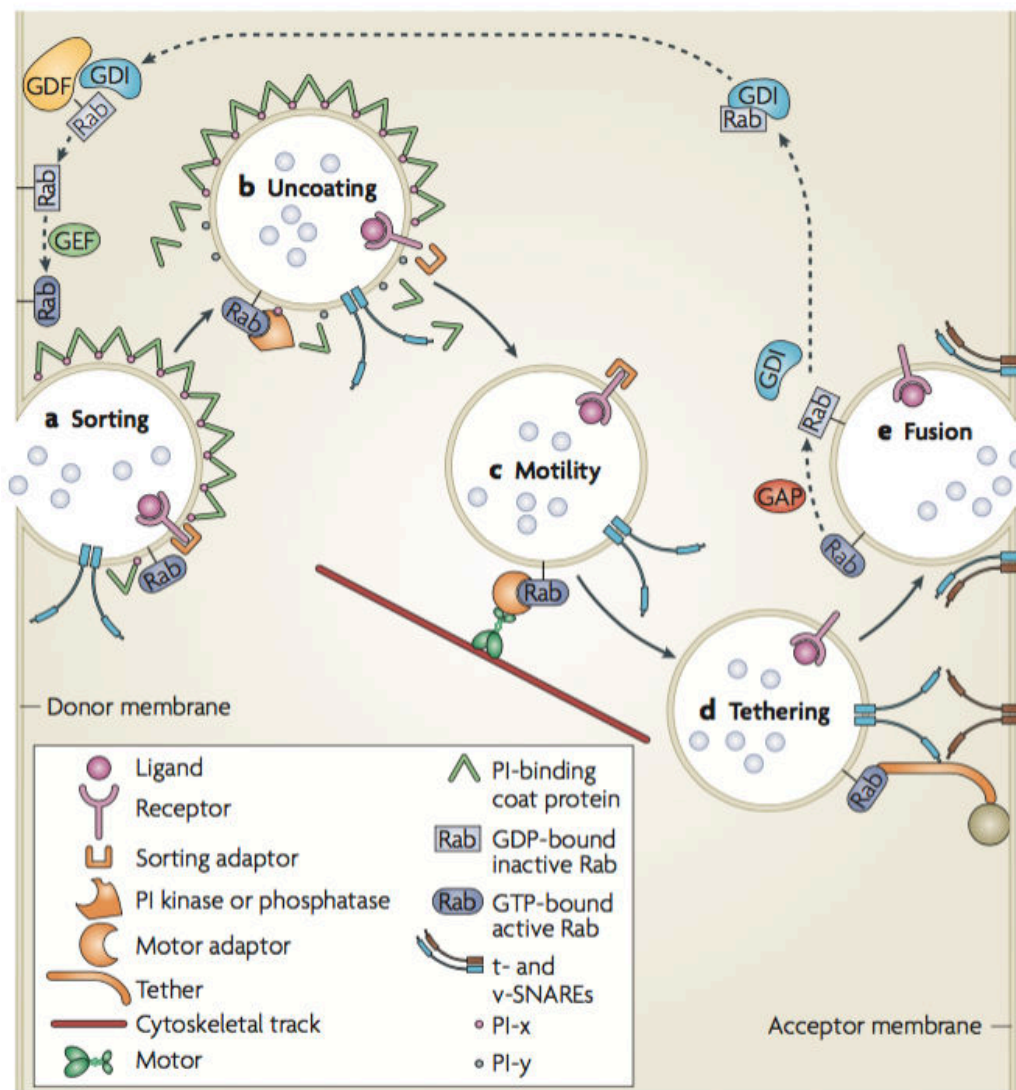


Figure 1.3.3. Les petites GTPases Rab jouent de multiples fonctions entre le compartiment donneur et le compartiment accepteur.

En recrutant divers effecteurs, les petites GTPases Rab participent à différentes étapes du transport intracellulaire comme l'endocytose/bourgeonnement depuis le compartiment donneur, le tri de cargos moléculaires, le déshabillage des vésicules d'endocytose, la motilité des vésicules sur les cytosquelettes, ainsi que l'arrimage et la fusion des vésicules avec le compartiment accepteur (Stenmark, 2009).

des endosomes de recyclage Rab11⁺. Une troisième voie endocytaire est définie par la maturation des compartiments endosomaux vers des compartiments dits « tardifs » caractérisés par la présence de Rab7 et Rab9. La fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes LAMP1⁺ conduit à la dégradation de leur contenu par les enzymes lysosomales, dont les hydrolases. Des compartiments intermédiaires particuliers, proches des lysosomes (« Lysosomal-related organelles»), existent et sont dédiés à la sécrétion régulée de cargos, comme les pigments de la peau contenus dans les mélanosomes. Les petites GTPase Rab32/Rab38 contribuent à la biogénèse de ces compartiments (Loftus et al., 2002; Tamura et al., 2011; 2009). Les granules cytolytiques des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs), mais aussi les granules de sécrétion des mastocytes et des plaquettes, seraient des compartiments similaires. La dégranulation de ces compartiments est notamment régulée par Rab27 (Haddad et al., 2001; Ménasché et al., 2000; Stinchcombe et al., 2001a).

1.3.1.3. Exemples d'effecteurs des protéines Rab

Les formes actives des petites GTPases Rab ont la capacité de recruter toute une variété de molécules impliquées dans différents processus du trafic intracellulaire. Je citerai ici de manière très succincte les moteurs moléculaires et les complexes d'arrimage/fusion membranaires, mais beaucoup d'autres familles d'effecteurs pourraient être présentées (**Fig.1.3.3**).

Les moteurs moléculaires

Les petites GTPases peuvent recruter différents types de moteurs moléculaires :

- Les myosines sont nécessaires au trafic intracellulaire dépendant du cytosquelette d'actine. La myosine V contribue par exemple au transport des

- mélanosomes *via* la petite GTPase Rab27a (interaction indirecte *via* la mélanophiline) (Strom et al., 2002).
- Les kinésines sont impliquées dans le transport de cargos sur de plus longues distances et dirigés vers l'extrémité positive des microtubules. Un exemple de transport coordonné par l'interaction Rab-Kinésine est la translocation du transporteur au glucose GLUT4 depuis des compartiments péricentriolaires vers la membrane plasmique qui est dépendante de l'interaction directe entre Rab4 et de la kinésine KIF3 (Imamura et al., 2003).
- Les dynéines sont mises en jeu dans le transport rétrograde des cargos dirigés vers l'extrémité négative des microtubules. Un exemple est l'interaction indirecte de Rab7 avec le complexe activateur de la dynéine, la dynactine (p150glued), qui permet le transport de compartiments tardifs (Jordens et al., 2001).

Il est notable que l'action des moteurs moléculaires ne se résume pas à la mobilité de compartiments sur une distance donnée, mais contribue également à induire des forces notamment nécessaires au bourgeonnement/fission de compartiments ou encore à la cytokinèse.

Les complexes d'arrimage et de fusion membranaires

Le transport entre deux compartiments se termine par l'arrimage et la fusion des cargos avec le compartiment accepteur. Le complexe d'arrimage (« tethering complex », en anglais) peut mettre en jeu différents effecteurs dont je reparlerai par la suite. La fusion membranaire à proprement parlé met en jeu des protéines SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) afin de faire face aux barrières énergétiques s'opposant à la fusion des membranes. Les protéines SNAREs sont organisées en deux groupes. Les protéines SNAREs vésiculaires (v-SNAREs) sont portées par les vésicules, tandis que les « target-SNAREs » (t-

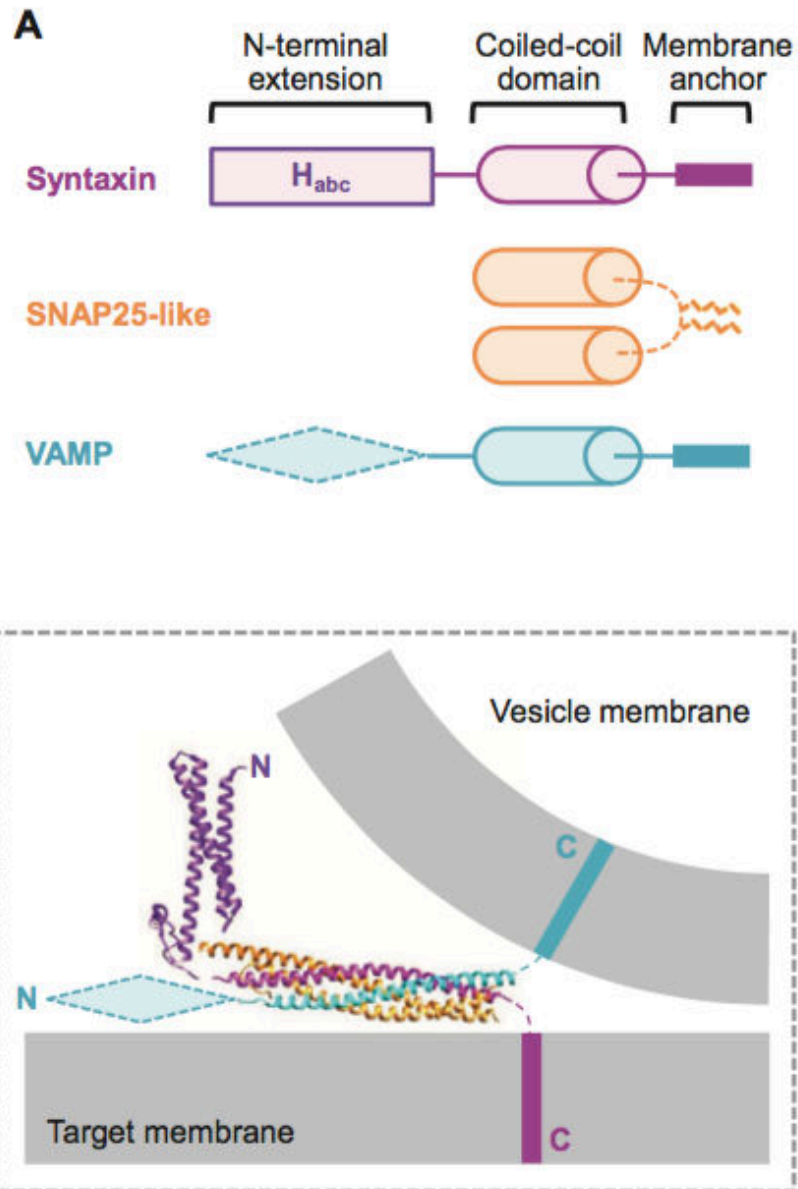


Figure 1.3.4. Les protéines SNAREs et la fusion membranaire.

Les protéines SNAREs présentent un domaine « coiled-coil » (2 domaines pour les SNAREs de type SNAP25). Ces domaines interagissent afin d'apposer les membranes cible et vésiculaire. Les protéines v-SNAREs portent un domaine N-terminal longine régulant leur fonction (pointillé) ou bien un domaine extracellulaire court (famille des brévines) (Daste et al., 2015).

SNAREs) sont arborées par les compartiments receveurs. Leur motif SNARE leur permet de s'associer et de former des polymères stables (configuration trans) nécessaires à l'apposition des vésicules à une distance très proche du compartiment receveur (**Fig.1.3.4**), puis à la courbure des membranes précédant la fusion de celles-ci par passage en configuration cis (Y. A. Chen and Scheller, 2001; Daste et al., 2015). Il est intéressant de noter que l'activité de fusion induite par les protéines SNAREs peut être régulée par plusieurs facteurs, et notamment le calcium. Par ailleurs, différents types de protéines SNAREs et molécules associées peuvent être impliqués dans les événements de fusion membranaire. Bien que les structures similaires des différentes protéines SNAREs suggèrent des fonctions redondantes, les recherches actuelles montrent une spécialisation de ces protéines dans le type de compartiments dont elles régulent les fusions. Les protéines v-SNAREs sont notamment subdivisées en deux groupes : *i.* les brévinines (VAMP1, VAMP2, VAMP3 et VAMP8), *ii.* et les protéines SNAREs portant un domaine longine, représentées par les v-SNAREs VAMP7 (TI-VAMP, Tetanus-Insensitive-VAMP), Sec22 et Ykt6. VAMP4 présente une structure quelque peu différente et peut être classée dans un groupe à part (Filippini et al., 2001).

1.3.2. La polarisation du MTOC à la synapse immunologique

Le recrutement du MTOC à la synapse immunologique et la polymérisation du cytosquelette de microtubules constituent des événements majeurs indispensables à la polarisation d'un certain nombre d'organelles comme l'appareil de Golgi et les endosomes (Martín-Cófreces et al., 2014). Notamment, les microtubules constituent de véritables rails, supports du trafic de cargos intracellulaires à l'aide de moteurs moléculaires et adaptateurs divers. Comment se fait ce remaniement du cytosquelette à la synapse immunologique ?

1.3.2.1. Molécules impliquées dans la polarité du MTOC à la synapse immunologique

Il a été montré par notre équipe et par d'autres que la signalisation proximale (p56^{Lck}, ZAP-70, LAT) est nécessaire à la polarisation du MTOC (Blanchard et al., 2002; Kuhné et al., 2003; Lowin-Kropf et al., 1998; Tsun et al., 2011). Le groupe de Morgan Huse a démontré dans des cellules T étalées sur une surface recouverte de pCMHs photoactivables que le DAG produit par l'activité de PLC γ 1 est suffisant pour induire la polarisation focalisée du MTOC à la synapse immunologique (Quann et al., 2009). En effet, en réponse à la production localisée de DAG à la synapse, les PKC dites nouvelles (nPKC), PKC ϵ , PKC η et PKC θ y sont recrutées séquentiellement et jouent un rôle important dans le recrutement du MTOC (X. Liu et al., 2013; Quann et al., 2009). Ainsi l'inhibition du recrutement des nPKCs conduit à une absence de polarisation du MTOC. Cependant, plusieurs groupes y compris le nôtre ont également montré que les PKC atypiques (aPKC) dont l'activité est indépendante du DAG, sont nécessaires à la polarisation du MTOC à la synapse formée entre des lymphocytes T et des CPAg (Bertrand et al., 2010; Chemin et al., 2012; Gérard et al., 2007; Real et al., 2007; Tourret et al., 2010). Notamment, les aPKC interviennent dans le complexe de polarité Par (« partitioning defective polarity complex ») (Hurov et al., 2004). Il a notamment été montré dans les lymphocytes T que l'expression de formes dominantes négatives de Par6 influe négativement sur la polarisation du MTOC de lymphocytes T en migration (Real et al., 2007). Par ailleurs, la protéine Par1b (MARK2) régule la polarité du MTOC à la synapse et il est proposé que Par1b contrôle le recrutement de Par3 à la synapse immune (Lin et al., 2009). L'absence de Par1b est associée à une hyper-réactivité des T CD4⁺ *in vitro* et à des désordres immunitaires *in vivo* (Hurov et al., 2001). Les deux modèles de polarisation du MTOC dépendantes des nPKCs ou des aPKCs ne sont pas incompatibles et doivent même coexister. Plusieurs preuves d'une activation indirecte de Par1b par les nPKCs ont été mises en évidence dans différents types cellulaires (Lin et al., 2009; Watkins et al., 2008). Enfin les complexes Crumbs et Scribble, qui sont importants pour la polarité des cellules épithéliales

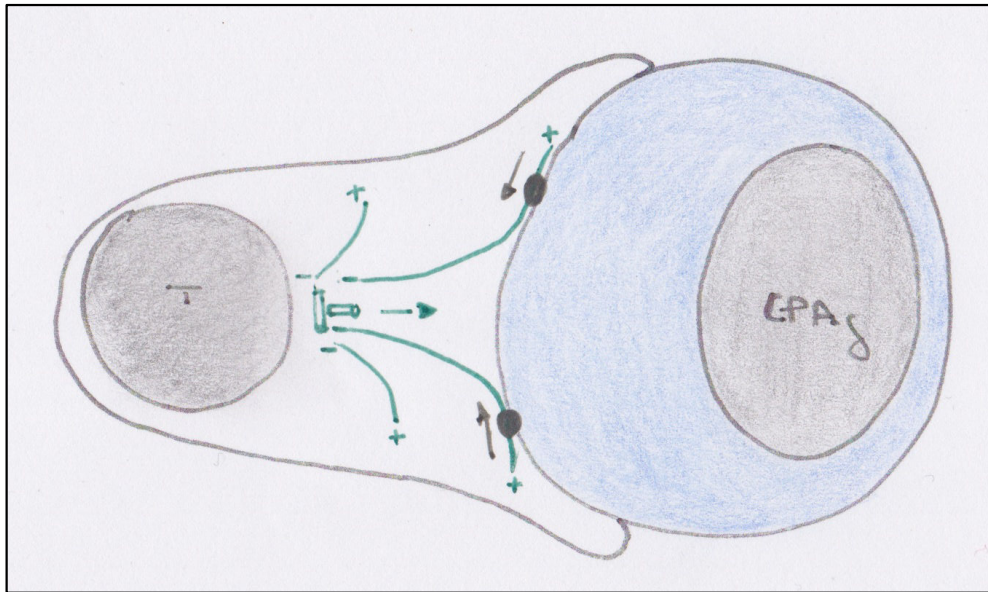
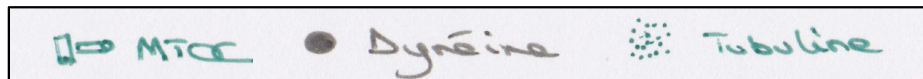
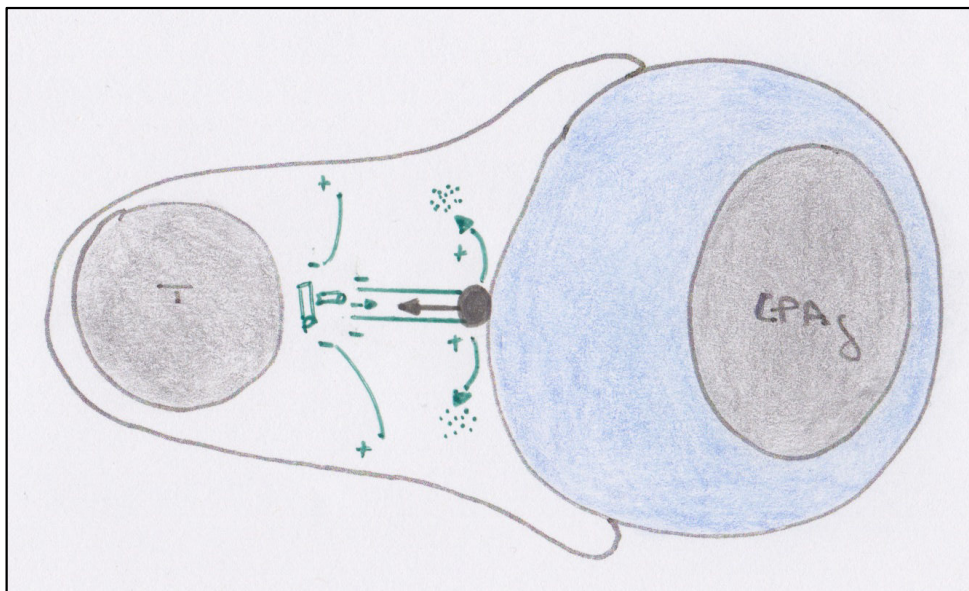
a**b**

Figure 1.3.5. Modèles de recrutement du MTOC à la synapse immunologique.

(a) Modèle de glissement : dans ce modèle, la dynéine (allant vers l'extrémité négative des microtubules) est ancrée au pSMAC de la synapse et induit un glissement des microtubules vers la périphérie de la synapse. Cela provoque un rapprochement du MTOC au centre de la synapse. (b) Modèle de capture/rétrécissement des microtubules : dans ce modèle, la dynéine est ancrée au centre de la synapse. La capture des microtubules associée à l'activité de la dynéine dirigée vers l'extrémité négative des microtubules, et à la dépolymérisation de l'extrémité positive, induit un rapprochement du MTOC au centre de la synapse.

(Macara, 2004), présentent des localisations très dynamiques dans les lymphocytes T en migration ou établissant des synapses immunologiques (Ludford-Menting et al., 2005). Cela suggère que ces complexes de polarité jouent également un rôle dans la polarisation du MTOC à la synapse (Krummel and Macara, 2006). Il a notamment été montré par le groupe d'Andrés Alcover que la protéine Dlg1, qui forme un complexe avec Scribble, collabore avec une protéine de liaison de la membrane plasmique au cytosquelette d'actine (Ezrine) et contribue au positionnement des microtubules à la périphérie de la synapse et à la polarisation du MTOC vers la synapse (Lasserre et al., 2010).

1.3.2.2. Déplacement du centrosome vers la synapse immunologique

Les travaux de Morgan Huse ont établi un lien direct entre la production de DAG, l'activité PKC et le recrutement de moteurs moléculaires comme la dynéine à la synapse immunologique (Combs et al., 2006; X. Liu et al., 2013; Quann et al., 2009). Les mécanismes induisant ce recrutement sont encore mal compris aujourd'hui voire même controversé et je n'entrerai pas dans ces détails (Huse, 2012). Cependant, en lien avec les molécules de polarité décrites dans la **partie 1.3.2.1**, une association directe entre la protéine de polarité Par3 et la dynéine a été décrite dans d'autres types cellulaires (Schmoranzler et al., 2009). Le mécanisme par lequel la dynéine réoriente le MTOC à la synapse immunologique a fait l'objet de débats. Il a ainsi été proposé que l'établissement des microtubules à la périphérie de la synapse notamment à l'aide de l'eitrine (Lasserre et al., 2010) et l'activité de la dynéine également ancrée à la synapse et « marchant » de l'extrémité positive vers l'extrémité négative des microtubules induit une force de « pulling » sur ces microtubules. Cela induit leur glissement vers la périphérie de la synapse et permet ainsi le recrutement du MTOC (Kuhn and Poenie, 2002) (**Fig.1.3.5a**). Des expériences plus récentes ont permis de proposer un second modèle dans lequel la capture de microtubules « pionniers » par la dynéine associée à la dépolymérisation de l'extrémité positive de ces microtubules

induirait un mouvement du MTOC vers la synapse immune (Yi et al., 2013) (**Fig.1.3.5a**).

1.3.2.3. Rôle du MTOC à la synapse immunologique

La polarisation du MTOC et le remaniement du cytosquelette de microtubules jouent un rôle important dans la polarité de la cellule et d'une manière générale dans la réorganisation globale de la cellule T. Comme il a déjà été souligné auparavant (**partie 1.2.4.4**), la synapse est une zone de sécrétion focalisée de différents cargos contenant des cytokines ou des granules cytolytiques. Notre équipe a notamment montré que la polarisation du MTOC est aussi importante pour la sécrétion à la synapse du récepteur CD40L (CD154) dont la liaison avec CD40 à la surface de la CPAg constitue une fonction T « helper » importante (Tourret et al., 2010).

De manière très intéressante, la signalisation T induit la polarisation du MTOC et l'établissement « des rails » de microtubules à la synapse qui régulent en retour la dynamique des microclusters formés et la signalisation distale (Lasserre et al., 2010). Des défauts de polarisation du MTOC conduisent à des défauts de formation de la synapse, une signalisation peu soutenue (Martín-Cófreces et al., 2008) ainsi que des défauts de production de cytokines (Quann et al., 2011). Ces observations suggèrent ainsi un rôle important du cytosquelette de microtubules dans la régulation des microclusters pré-formés à la membrane plasmique notamment par ses liens avec le cytosquelette d'actine. Cependant, il peut aussi être envisagé que le cytosquelette de microtubules soit également le vecteur d'un transport intracellulaire de cargos portant différentes molécules de signalisation. Il contribuerait au maintien/soutien de la signalisation à la synapse immunologique. Un nombre croissant de preuves pointe en effet la synapse comme une plateforme organisant un transport vésiculaire intense de molécules de signalisation nécessaire à la fonction lymphocytaire T.

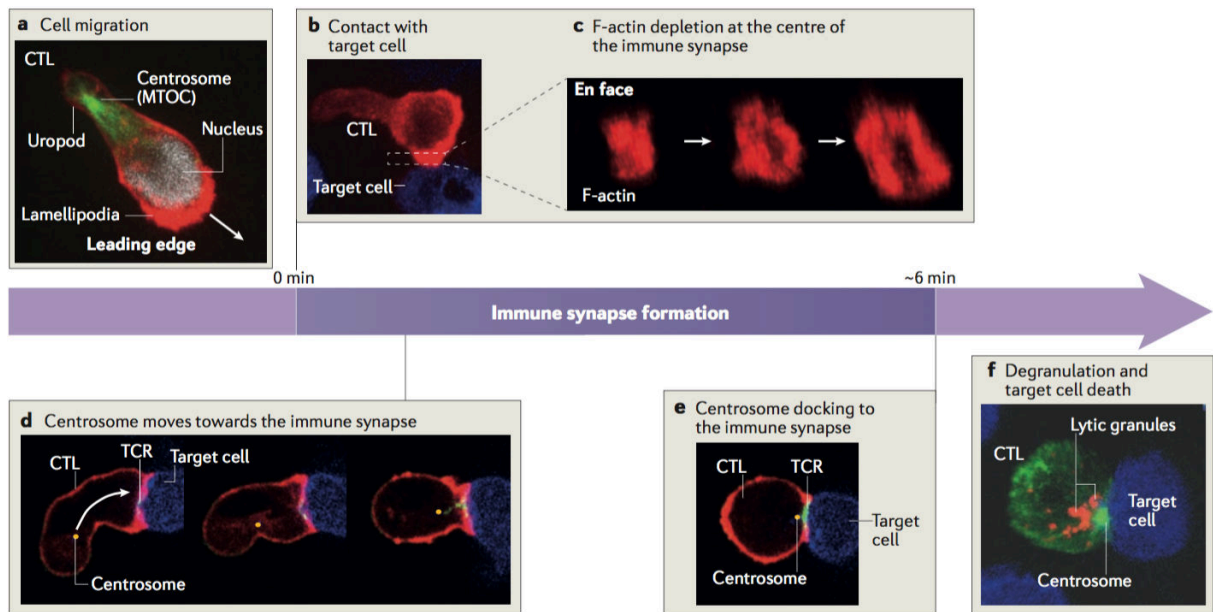


Figure 1.3.5. Mise en place d'une synapse cytolytique par des CTLs conduisant à la sécrétion des granules cytotoxiques.

(a) Les CTLs migrent dans les tissus à la recherche d'une cellule cible spécifique. (b-c) La rencontre avec la cellule cible induit un arrêt de la migration et l'établissement d'une synapse notamment caractérisée par l'exclusion de l'actine polymérisée (rouge) au centre de la synapse. (d-e) Le centrosome est polarisé vers la synapse (en 5 à 7 minutes). Il est proposé qu'il s'arrime à la synapse. (f) Les granules cytolytiques sont transportés à la synapse pour y être sécrétés afin d'induire la cytolysse de la cellule cible (la Roche et al., 2016).

1.3.3. Le trafic intracellulaire dans les lymphocytes T

La compréhension de certaines voies du transport intracellulaire et de son rôle dans la réponse lymphocytaire T a constitué la question majeure posée au cours de cette thèse. Je détaillerai donc dans cette partie certaines voies ou acteurs connues du trafic intracellulaire dans les lymphocytes T.

1.3.3.1. La sécrétion des granules cytotoxiques

Du fait de l'existence de pathologies associées, chez l'homme, à des défauts d'activité cytolytiques des CTLs, les mécanismes de transport et de sécrétion des granules cytotoxiques ont été relativement bien caractérisés (**Fig.1.3.5**). La dégranulation des CTLs constitue ainsi un modèle intéressant de transport intracellulaire dans le lymphocyte T et je choisis donc de détailler ce processus.

Machinerie de maturation et de sécrétion des granules cytotoxiques

Les granules cytotoxiques contiennent des effecteurs cytotoxiques (perforines et granzymes) qui sont sécrétés à la synapse et conduisent à la lyse des cellules tumorales ou infectées. Ces compartiments sont des organelles hybrides issues d'une biogénèse mettant en jeu : endosomes de recyclage, endosomes tardifs, et lysosomes (de Saint Basile et al., 2010). Cette biogénèse implique plusieurs étapes de maturation et s'achève juste avant la sécrétion à la synapse. Plusieurs déficiences génétiques de la machinerie de sécrétion des granules ont été identifiées chez l'homme et causent des lymphohistiocytoses hémophagocytiques (HLH) graves. Chez ces patients, l'absence de cytotoxicité médiée par les granules cytotoxiques induit des désordres immunitaires qui surviennent à la suite d'une infection virale. En effet, la persistance de la présentation antigénique liée à l'absence de la clairance virale entraîne un emballement de la réponse T CD8⁺, une sécrétion massive d'IFN- γ et l'induction d'un

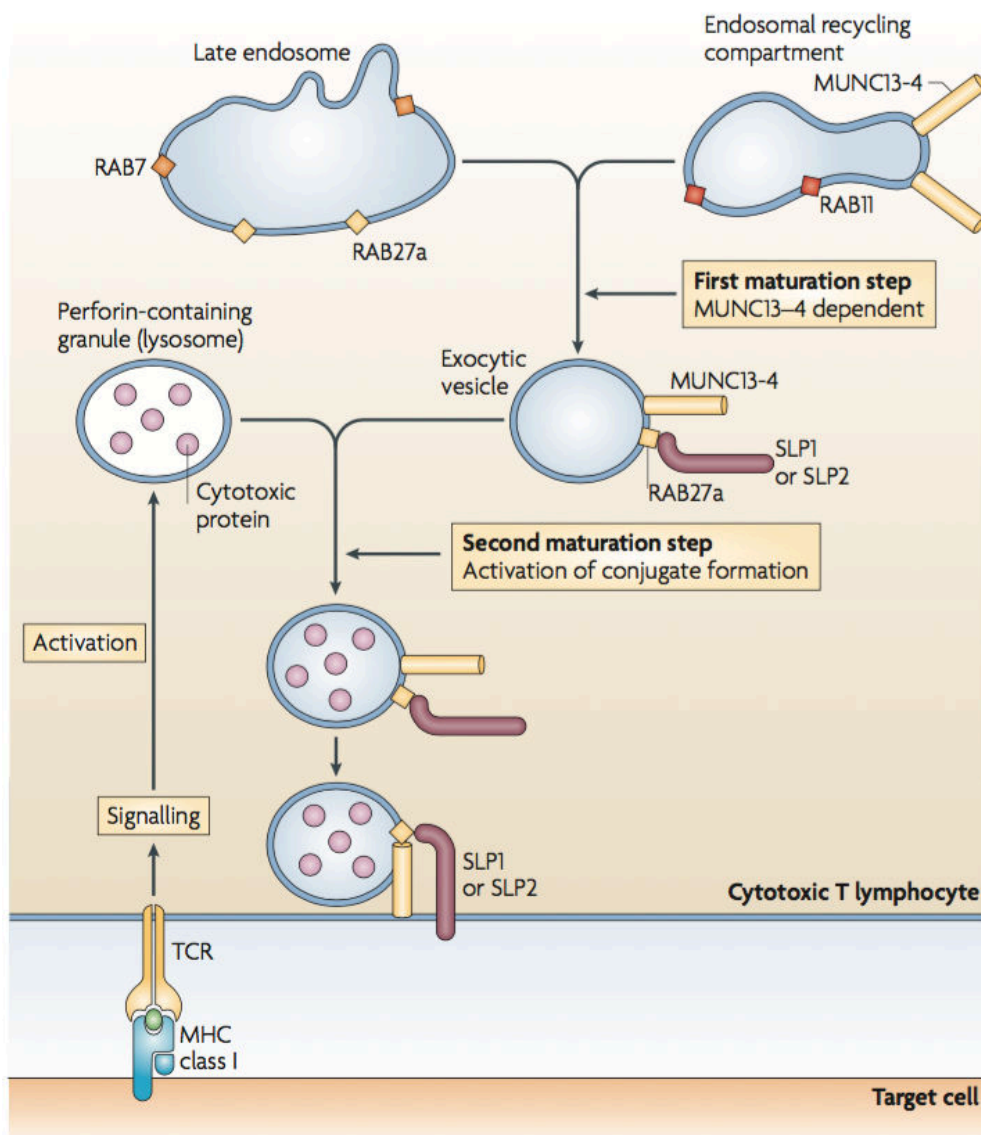


Figure 1.3.6. Modèle de maturation des granules cytolytiques avant leur sécrétion à la synapse formée entre une CTL et une cellule cible.

Une première étape de maturation dépendante du facteur Munc13-4 permet la fusion entre des compartiments endosomaux tardifs (Rab7⁺) et des compartiments de recyclage (Rab11⁺). Cela permet de générer des vésicules exocytiques. L'engagement du TCR par la cellule cible induit une seconde étape de maturation constituée par la fusion de ces vésicules exocytiques avec les granules contenant les molécules de cytotoxicité. Cela permet ainsi le transport et l'arrimage/fusion des granules à la synapse immunologique. (de Saint Basile et al., 2010).

contexte inflammatoire grave associé à des destructions tissulaires (Jordan et al., 2004; Sepulveda et al., 2013).

Ainsi, des mutations conduisant à la perte d'expression de la petite GTPase Rab27a (Ménasché et al., 2000) et de la protéine accessoire Munc13-4 (Feldmann et al., 2003) ont été décrites. L'étude de ces deux protéines chez des patients ou des souris KO (souris ashen, Rab27a^{-/-} (S. M. Wilson et al., 2000)) a montré qu'elles sont nécessaires à la fusion des granules cytotoxiques qui sont toutefois correctement polarisées à la zone synaptique (Feldmann et al., 2003; Haddad et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001a). Plusieurs étapes de maturation de compartiments intracellulaires nécessaires à la génération des granules cytotoxiques ont été mises en évidence (Ménager et al., 2007). En effet, bien que Rab27a et Munc13-4 soient impliquées dans la sécrétion de granules, ces protéines de transport ne sont pas présentes dans les compartiments perforine⁺ avant l'établissement d'une synapse immunologique (**Fig.1.3.6**). Rab27a est localisée dans un compartiment endosomal tardif (Rab7⁺) ainsi que dans des endosomes de recyclages (Rab11⁺) dans lesquels Munc13-4 est également présent. En absence de Munc13-4, Rab27a est délocalisée des endosomes de recyclage certainement parce que Munc13-4 contrôle la fusion des compartiments Rab7⁺ et Rab11⁺ générant des vésicules destinées à l'exocytose (vésicules exocytiques) (Ménager et al., 2007). Cette fusion est par ailleurs, indépendante de l'expression de Rab27a. Après cette première étape de maturation, une seconde étape de fusion intervient à la synapse immunologique entre les vésicules exocytiques contenant la machinerie de fusion membranaire et les compartiments d'origine lysosomaux (LAMP1/2⁺) contenant la perforine/granzyme (**Fig.1.3.6**).

Le transport de ces granules cytotoxiques nécessite également des moteurs moléculaires. Contrairement aux cellules neuronales et aux mélanocytes, le transport des vésicules exocytiques Rab27a⁺ vers la zone sécrétoire de la synapse ne fait pas intervenir la myosine Va, un moteur s'associant à l'actine (Ménasché et al., 2000). Cela est en accord avec les observations de l'exclusion du cytosquelette d'actine au centre de la synapse formée par les CTLs (Stinchcombe et al., 2001b; 2006) (**Fig.1.3.5**). En

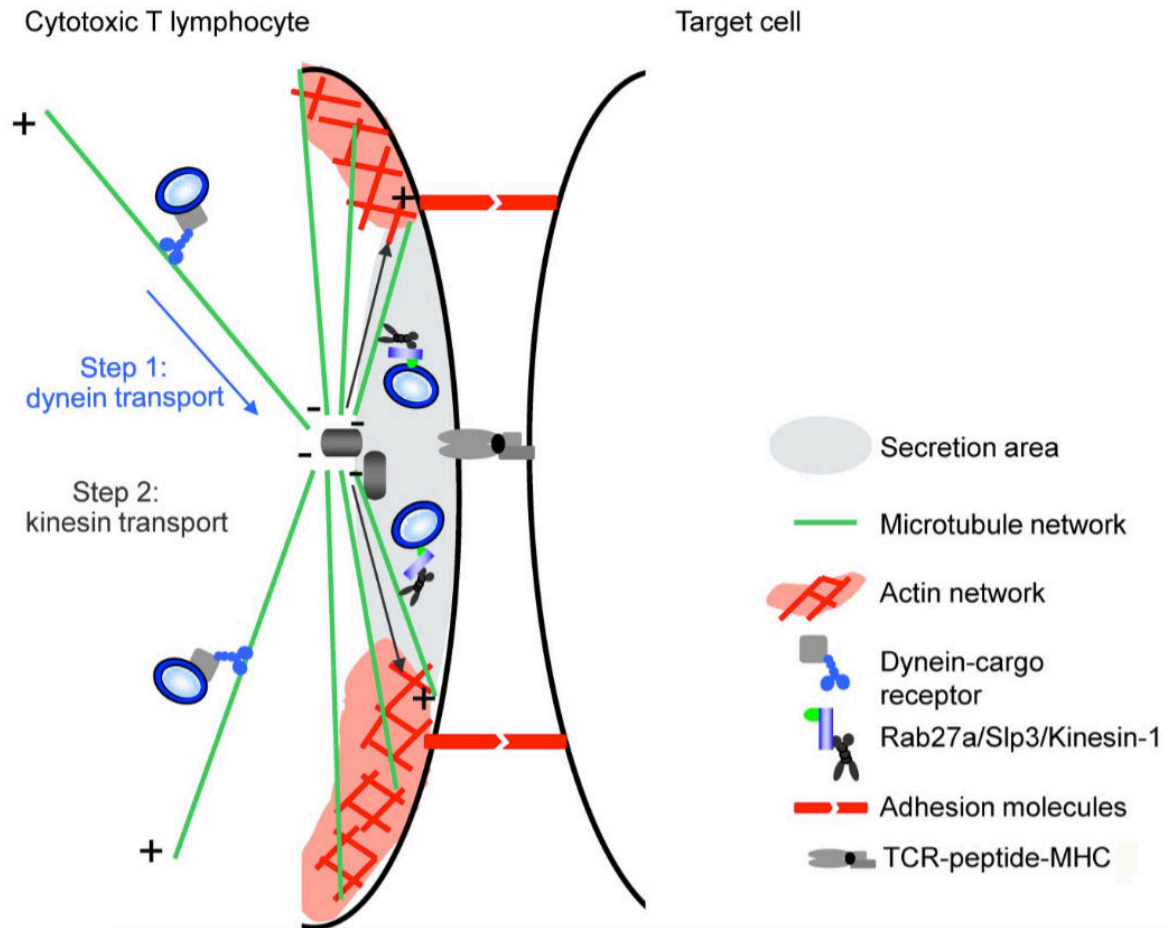


Figure 1.3.7. Modèle de transport des granules cytotoxiques via le cytosquelette de microtubules.

Une première étape de polarisation des granules cytotoxiques est déterminée par leur transport rétrograde vers le MTOC des granules et est dépendant de la dynéine. La seconde étape consiste en un transport antérograde des granules vers l'extrémité positive des microtubules permettant leur recrutement à la synapse immunologique (Kurowska et al., 2012).

revanche, le transport terminal des granules cytotoxiques à la synapse immunologique fait intervenir la kinésine-1, un moteur s'associant aux microtubules ce qui souligne l'importance de ce cytosquelette (Kurowska et al., 2012) (**figure 1.3.7**). L'effecteur Slp3 (synaptotagmin-like protein-3) qui interagit avec la forme active de Rab27a constituerait un adaptateur liant la kinésine-1 et les granules cytotoxiques. En absence de la chaîne lourde de la kinésine-1 (Kif5b), une diminution du recrutement terminal des vésicules Rab27a à la synapse immunologique est observée par microscopie TIRF et est associée à des défauts de dégranulation. La sécrétion des granules cytotoxiques à la synapse immunologique nécessite aussi leur attachement puis leur fusion avec la membrane plasmique. La protéine Munc13-4 joue aussi un rôle dans cette étape d'attachement et/ou de fusion des lysosomes sécrétoires à la membrane plasmique (Neeft et al., 2005).

Les étapes tardives de transport ou de fusion à la synapse font intervenir d'autres molécules effectrices de Rab27a : Slp1 et Slp2, (Holt et al., 2008; Ménasché et al., 2008) (**Fig.1.3.6**). Ainsi, l'expression d'une forme dominante négative de Slp2, entraîne la polarisation sans transport terminal des granules Rab27a et un défaut d'exocytose de ces granules. Le rôle moléculaire de Slp-1 et Slp-2 reste mal compris et il est proposé que ces effecteurs de Rab27a contribuent à l'arrimage des vésicules à la synapse.

Cet arrimage des granules cytotoxiques à la synapse se poursuit par leur fusion avec la membrane plasmique, nécessaire à la sécrétion de leur contenu et à l'induction de la mort de la cellule cible. Des formes de HLH causées par des mutations de la t-SNARE syntaxin-11 et de sa molécule partenaire Munc18-2 (STXBP2) ont été détectées chez certains patients (Côte et al., 2009; Stadt et al., 2009) et étudiées chez la souris (Sepulveda et al., 2013). Dans la synapse formée par les cellules NK déficientes pour Munc18-2, les granules cytotoxiques sont polarisés mais ne fusionnent pas. Ainsi, bien qu'il soit encore mal compris comment le complexe syntaxin-11/Munc-18-2 s'intègre dans la machinerie de sécrétion des granules, il est fortement envisagé que ce complexe accepteur soit présent à la membrane plasmique et participe à la fusion terminale des granules. Les protéines v-SNAREs nécessaires

à l'arrimage/fusion des granules cytolitiques à la synapse n'ont pas clairement été identifiées. Dans les souris VAMP8 KO, des défauts de dégranulation ainsi que des défauts importants de cytotoxicité ont été décrits et VAMP8 a été proposé comme une v-SNARE impliquée directement dans les événements de fusion terminale des compartiments lysosomaux à la membrane plasmique (Dressel et al., 2010; Loo et al., 2009). Une autre étude réalisée chez l'homme propose que la dégranulation soit précédée par l'apport de cargo contenant la syntaxin-11 à la membrane plasmique. Ce transport dépendant de VAMP8 régulerait la fusion des granules cytolitiques (Marshall et al., 2015). Enfin, les v-SNAREs VAMP4 et VAMP7 ont également été proposées comme des partenaires de la fusion des granules à la membrane dans les cellules NK (Krzewski et al., 2011).

1.3.3.2. Le transport intracellulaire des molécules de signalisation proximales

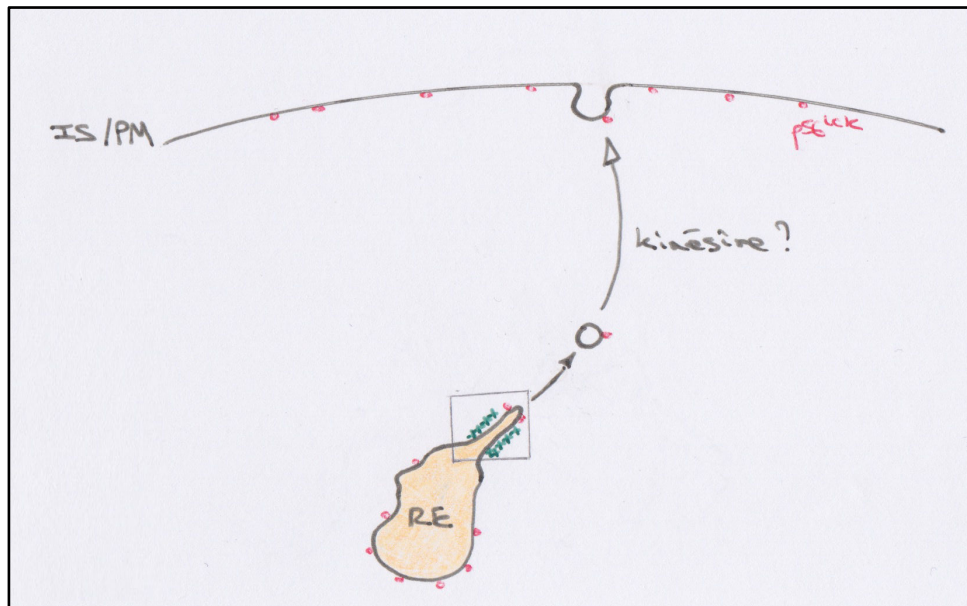
Le trafic de p56^{Lck}

p56^{Lck} est une kinase de la famille Src nécessaire à la phosphorylation des domaines ITAMs portées par les chaînes CD3 associées au TCR (Karnitz et al., 1992; Straus and Weiss, 1992; van Oers et al., 1996). Les observations du groupe d'Oreste Acuto ont permis de déterminer qu'une fraction cellulaire importante de p56^{Lck} est active dans les lymphocytes T au repos (50% dans les cellules T Jurkat et 40% dans les lymphocytes T CD4⁺ primaires) (Nika et al., 2010). Cela suggère que la phosphorylation du TCR au sein du lymphocyte T doit être régulée suivant une ou plusieurs stratégies. L'activité de la phosphatase CD45 jouerait un rôle important dans la déphosphorylation du TCR. Il est en effet proposé que l'exclusion de CD45 lors de la formation de « contacts proches » du lymphocyte T permette la phosphorylation du TCR indépendamment de l'antigène ainsi qu'une signalisation en aval du TCR (V. T. Chang et al., 2016) (**vidéo 1.1**). Cependant, les travaux récents de Ronald D. Vale suggèrent que l'activité de CD45 n'est pas suffisante à elle seule pour réguler la phosphorylation du TCR à l'état de repos (Su et al., 2016). En effet, la reconstitution

d'une machinerie de signalisation TCR efficace avec des protéines recombinantes insérées dans des bicouches lipidiques a montré que CD45 est spontanément ségrégée des microclusters CD3 ζ /ZAP-70/LAT/Grb2/Gads/Sos1/SLP-76, probablement pour des questions de charges. Par ailleurs, CD45 semble insuffisante pour induire la déphosphorylation des molécules LAT lorsque celles-ci sont regroupées sous la forme de microclusters, indiquant que les protéines clusterisées restent protégées de l'activité de la phosphatase CD45 (Su et al., 2016) et que d'autres formes de régulation doivent co-exister. Les analyses en microscopie PALM/dSTORM menées par le groupe de Katharina Gaus suggèrent que l'activité de p56^{Lck} est régulée par sa localisation dans des nanoclusters pré-existants à l'état de repos (Rossy et al., 2013a). Notamment, la formation de clusters de p56^{Lck} lui serait intrinsèque et dépendrait de sa conformation ouverte (active, Y505 déphosphorylée) favorable au regroupement des molécules de p56^{Lck} (Rossy et al., 2013a). Une autre possibilité de régulation de l'activité de p56^{Lck}, qui n'exclut par les observations précédentes et qui repose également sur la régulation de sa localisation, est la compartimentalisation de p56^{Lck} dans des vésicules intracellulaires. En effet, p56^{Lck} est présente à la membrane plasmique et dans des compartiments positifs pour le récepteur à la transferrine (TfR) et Rab11 (Ehrlich et al., 2002; Soares et al., 2013a). Ces compartiments intracellulaires sont recrutés à la synapse immunologique en réponse à une stimulation du TCR.

Plusieurs groupes se sont intéressés à la régulation de ce trafic. Le groupe de Miguel A. Alonso a étudié le rôle de la protéine MAL qui contrôle le transport polarisé de cargos à la surface apicale dans les cellules épithéliales. Il a montré que MAL joue un rôle important dans le transport de p56^{Lck} depuis les compartiments péricentriolaires Rab11⁺ vers la périphérie cellulaire dans les cellules au repos, pointant un recyclage constitutif de cette kinase (Antón et al., 2008). L'absence de MAL conduit aussi à un défaut de recrutement de p56^{Lck} à la synapse immunologique après l'engagement du TCR, suggérant que le trafic de p56^{Lck} vers la synapse emprunte les mêmes voies de transport que dans les cellules au repos (Antón et al., 2008; Soares et al., 2013a).

a



b

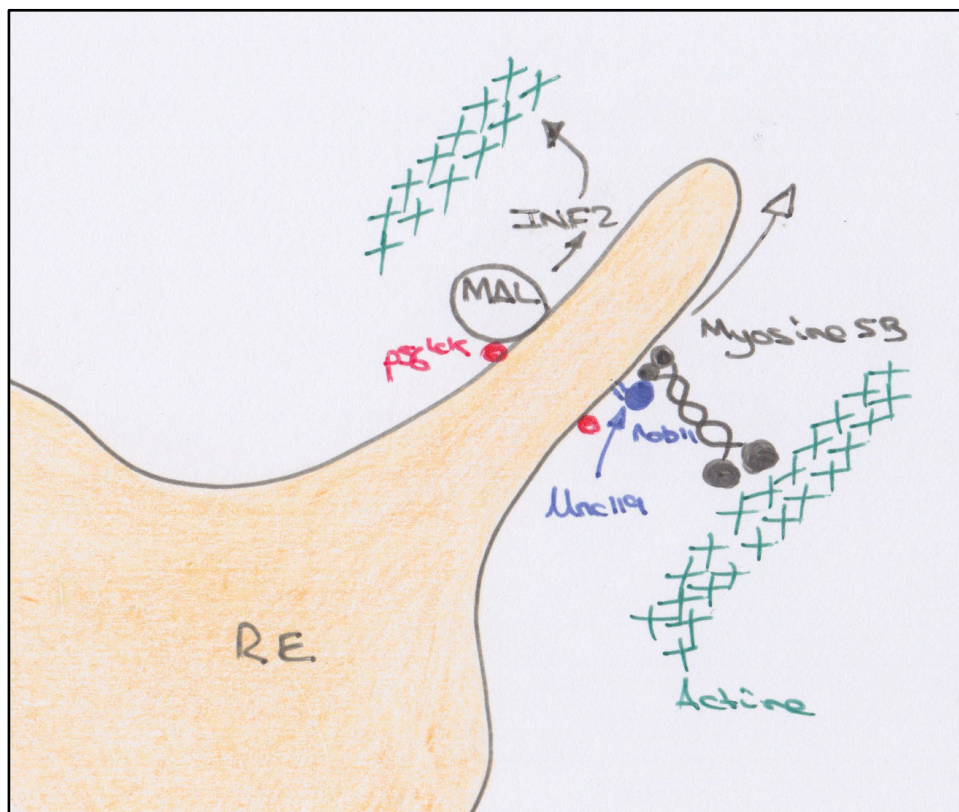


Figure 1.3.8. Modèle de transport de p56^{Lck} depuis les endosomes de recyclage Rab11⁺.

(a-b) p56^{Lck} interagit avec la protéine MAL qui, avec sa formine associée (INF2), contribue à la polymérisation d'actine au niveau des endosomes de recyclage. Unc119, qui interagit également avec p56^{Lck}, favorise la forme Rab11-GTP. Cette forme active de Rab11 recruterait la myosine5B qui pourrait alors contribuer à exercer des forces de « pulling » nécessaires au bourgeonnement de vésicules depuis les endosomes de recyclage vers la périphérie cellulaire et, dans les conditions d'activation, vers la synapse immune.

MAL interagirait avec $p56^{Lck}$ et les deux molécules seraient co-transportées dans les mêmes vésicules. En absence de MAL, un défaut de la « sortie » des vésicules depuis les compartiments Rab11⁺ est observé. L'analyse plus avant du transport de $p56^{Lck}$ par le même groupe a permis de déterminer que la formine INF2 qui interagit directement avec MAL est nécessaire à la formation de ces vésicules (Andrés-Delgado et al., 2010). Ainsi, en absence de INF2, $p56^{Lck}$ et MAL ne sont pas transportées à la périphérie cellulaire ou à la synapse immunologique dans les conditions d'activation et s'accumulent dans des endosomes péricentriolaires. L'utilisation de latrunculine A, de cytochalasine D (inhibiteurs de la polymérisation de l'actine), de jasplakinolide (inducteur de la polymérisation d'actine) ou encore l'expression de mutants de INF2 ont permis de mettre en évidence que la polymérisation et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine sont importantes pour la sortie des cargos $p56^{Lck+}$ MAL⁺ depuis les endosomes de recyclage Rab11⁺ (Andrés-Delgado et al., 2010). Par ailleurs, il est proposé que les petites GTPases Rac1 et CDC42, qui constituent des régulateurs de la dynamique du cytosquelette d'actine, interagissent avec INF2 et participent ainsi au transport de $p56^{Lck}$ (Andrés-Delgado et al., 2010). L'adaptateur Unc119 (« Uncoordinated119 »), qui se lie également avec $p56^{Lck}$, est nécessaire au transport de cette dernière vers la périphérie cellulaire ou la synapse immune. Unc119 régulerait l'activité GTPase de Rab11 (Gorska et al., 2009). Ainsi, une altération des fonctions de Unc119 ou de Rab11 conduit à un transport altéré de $p56^{Lck}$ à la périphérie cellulaire qui phénocopie les cellules déficientes pour INF2 ou MAL (Gorska et al., 2009). Un modèle peut ainsi être proposé (**Fig.1.3.8**) pour lequel Unc119/Rab11 coopère pour le recrutement d'effecteurs de Rab11 dont la myosine5B. La présence de MAL et de sa formine associée INF2 contribue avec l'aide de Rac1 et CDC42 à la polymérisation d'actine au niveau des endosomes de recyclage. La myosine5B pourrait alors contribuer à exercer des forces de « pulling » nécessaires à la formation de vésicules depuis les endosomes de recyclage. Les vésicules ainsi formées seraient ensuite transportées vers la périphérie cellulaire *via* le cytosquelette de microtubules puisque le traitement des cellules avec du nocodazole (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) bloque le transport de $p56^{Lck}$ à la

périphérie de la cellule T (Andrés-Delgado et al., 2010; Ehrlich et al., 2002). Les défauts de transport de p56^{Lck} en absence de MAL ou de Unc119, sont associés à des défauts majeurs d'activation dans les cellules T Jurkat et dans les lymphocytes T primaires humains (phosphorylation de ZAP-70, LAT, ERK1/2, sécrétion d'IL-2, prolifération) montrant le rôle fonctionnel de ce transport intracellulaire (Antón et al., 2008; Gorska et al., 2004). Par ailleurs, des patients arborant des mutations de Unc119 proches d'un domaine impliqué dans son interaction avec le domaine SH3 de p56^{Lck}, présentent un transport altéré de p56^{Lck} associé à une lymphopénie et une immunodéficience (Gorska and Alam, 2012).

Le trafic intracellulaire du TCR

Un certain nombre de laboratoires se sont intéressés au trafic du complexe TCR/CD3 au sein des lymphocytes T. Des expériences réalisées par le groupe de Dario A. A. Vignali ont montré qu'à l'instar du TfR, le TCR présent à la surface des lymphocytes T est continuellement internalisé puis recyclé à la surface (H. Liu et al., 2000). Cette internalisation serait indépendante de l'engagement du TCR par le pCMH. Il est ainsi aujourd'hui proposé que la réorganisation des cytosquelettes d'actine et de microtubules dans les conditions d'activation conduit à un transport polarisé d'un certain nombre de cargos de recyclage, comme le TCR, le TfR et p56^{Lck}, vers la synapse immunologique dont l'organisation dépend de ce trafic intracellulaire (Batista et al., 2004; Benzing et al., 2013; Bouchet et al., 2016a; 2016b; Das et al., 2004; Ehrlich et al., 2002; Finetti et al., 2009; Onnis et al., 2016; Soares et al., 2013b). L'internalisation du complexe TCR/CD3 nécessite la reconnaissance d'un motif DxxxLL présent sur la chaîne CD3 γ associée au TCR. Cette séquence est reconnue par les molécules adaptatrices AP-1 et AP-2 qui réguleraient l'internalisation du TCR dépendante de la clathrine (Dietrich et al., 1997). De manière intéressante, la mutation de cette séquence provoque un défaut d'enrichissement du TCR à la synapse immunologique (Das et al., 2004). De plus, la dépolymérisation du cytosquelette de microtubules par traitement des cellules T à la colchicine bloque également le recyclage des molécules de TCR à la synapse suggérant que son recrutement à la

zone synaptique requiert une internalisation et un transport intracellulaire dépendant du cytosquelette de microtubules.

Différentes molécules impliquées dans le recyclage du TCR ont été décrites. Notamment, les travaux de Gillian Griffiths pour les CTLs et de Cosima T. Baldari dans les lymphocytes T CD4⁺ humains suggèrent que la synapse est le site de la formation frustrée d'un cil primaire (Onnis et al., 2016; Stinchcombe et al., 2015). Ainsi, les travaux de Cosima T. Baldari montrent que la machinerie de formation du cil primaire des cellules ciliées régule le recyclage polarisé du TCR à la synapse immunologique. Notamment, les protéines de transport intraflagellaire IFT20, IFT52, IFT57 et IFT88 sont impliquées dans un complexe interagissant directement avec le TCR et jouent un rôle important dans le trafic des endosomes portant le TCR (Finetti et al., 2009; 2014). Le rôle des molécules IFT dans le recyclage du TCR est encore mal compris aujourd'hui. IFT20 interagirait avec la petite GTPase Rab5 qui régule les endosomes précoces. Dans des cellules n'exprimant pas IFT20, une diminution de la colocalisation entre Rab4 et le TCR et une augmentation de la colocalisation entre le TCR et Rab5 sont observées. Le TfR subit par ailleurs les mêmes effets liés à la perte d'expression d'IFT20 que le complexe TCR/CD3, ce qui est en accord avec l'observation que le TCR et le TfR sont co-immunoprécipités (Salmerón et al., 1995). Il a également été montré par le même groupe que la protéine Rab29 qui interagit avec IFT20 et qui est impliquée dans la croissance du cil primaire dans d'autres types cellulaires, est nécessaire au transport du TCR vers des compartiments de recyclage péricentriolaires Rab11⁺ (Onnis et al., 2015). La baisse d'expression de Rab29 conduit à une accumulation du TCR dans le compartiment d'endosomes de recyclage Rab11⁺, à des défauts de recyclage du TCR à la synapse immune et à une activation déficiente (induction de la voie ERK1/2, expression de CD69 et d'IL-2) dans les cellules T Jurkat ou des cellules T primaires humaines. Bien que le TCR semble transiter par des compartiments Rab11⁺, MAL n'est pas impliqué dans le recyclage du TCR à la périphérie cellulaire (Soares et al., 2013a). De plus, la petite GTPase Rab8 qui interagit avec Rab29, agirait en aval de IFT20 dans des étapes associées à la fusion des cargos TCR à la synapse immunologique (Finetti et al., 2015). Ceci est en accord avec

l'analyse de la localisation des molécules de signalisation proximales menée par le groupe d'Andres Alcover et montrant une colocalisation importante de CD3 ζ avec Rab8b mais aussi Rab3d et à moindre mesure Rab4b (Soares et al., 2013a). L'expression d'une forme hyperactive de Rab8 augmente le recyclage du TCR à la périphérie de la cellule mais en absence d'IFT20, l'effet hyperactif de la construction est perdu, démontrant le rôle central d'IFT20 dans la régulation des cargos portant le TCR (Finetti et al., 2015).

Aux cascades de petites GTPases Rab (Rab5, Rab4/Rab11, Rab29 et Rab8) suggérées par les travaux du groupe de Cosima T. Baldari, s'ajoute la fonction de la petite GTPase Rab35. En effet, la surexpression de sa GAP EPI64C ou l'expression d'une forme dominante négative de Rab35 (S22N) dans les lymphocytes T Jurkat induit la formation de vacuoles où s'accumulent le TfR et CD3 ζ . Ceci est associé à une diminution de l'enrichissement du TCR à la synapse immunologique (Patino-Lopez et al., 2008). Le mécanisme par lequel Rab35 régule le transport endosomal du TCR reste encore mal compris. Rab35 apparaît comme un régulateur important des endosomes (Klinkert and Echard, 2016). Il a notamment été montré dans d'autres types cellulaires que l'effecteur de Rab35, MICAL-L1, agit en tant que molécule d'échafaudage permettant le recrutement de protéines Rab, dont Rab8a, impliquées dans le recyclage polarisé de cargos (Kobayashi et al., 2014; Rahajeng et al., 2012). En accord avec les résultats du laboratoire de Cosima T. Baldari, Rab35 pourrait réguler la voie de recyclage du TCR en amont de Rab8. De plus, Rab35 intervient dans l'activation de Cdc42 et la régulation du cytosquelette d'actine (Chevallier et al., 2009). Il a d'ailleurs été montré que la GEF FGD6 qui assure l'échange GDP/GTP de Cdc42 contrôle le recyclage de cargos via le complexe nucléateur d'actine WASH (Steenblock et al., 2014). Les souris déficientes pour WASH arborent des défauts de recyclage du TCR et du transporteur de glucose Glut-1, qui sont accompagnés d'une réponse T (prolifération) peu soutenue (Piotrowski et al., 2013). Ces défauts de recyclage seraient liés à un défaut de tri des endosomes contenant les molécules de TCR qui serait conduit vers des compartiments de dégradation LAMP-1 plutôt que des compartiments de recyclage. Un phénotype similaire a été observé dans des cellules

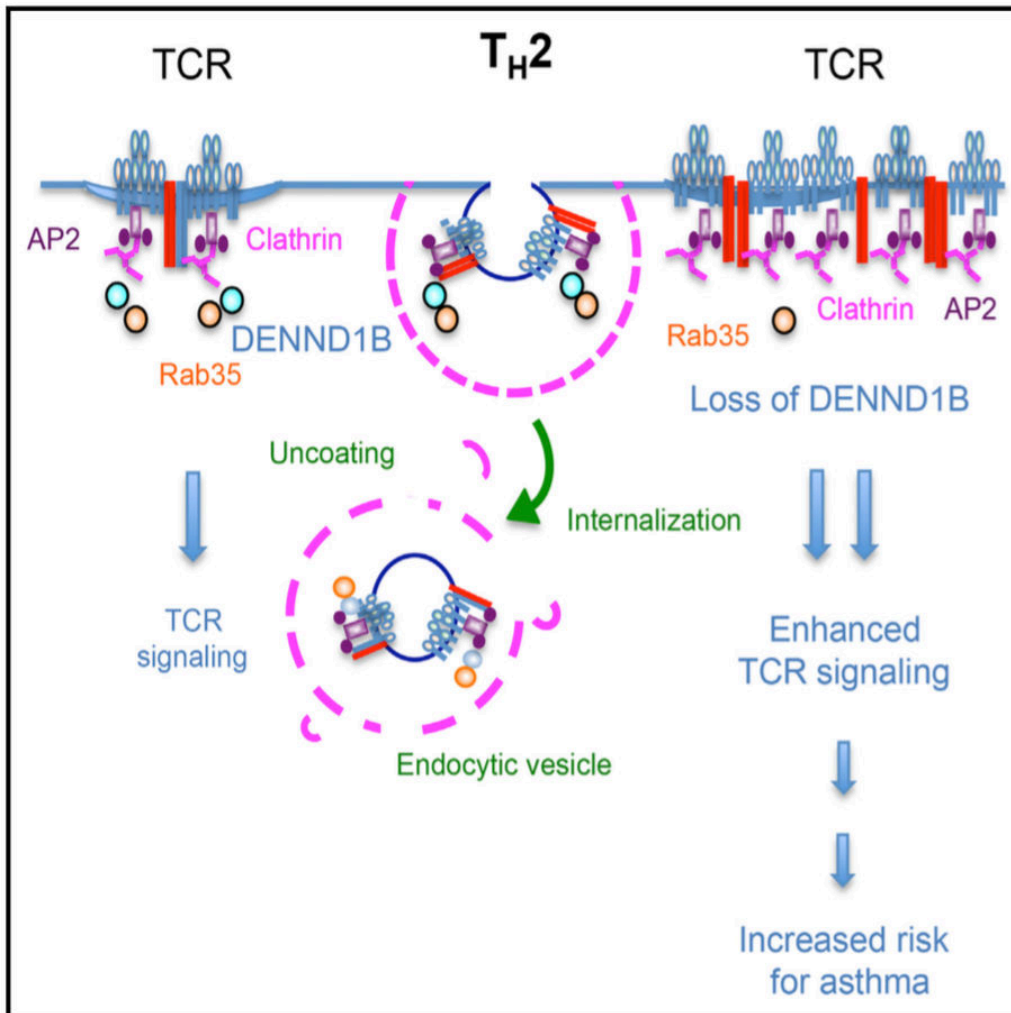


Figure 1.3.9. Modèle de « downmodulation » du TCR induite par l'activation et dépendante de Rab35.

Dans la sous-population Th2 des lymphocytes T CD4⁺, la GEF de Rab35 DENND1b est recrutée par la molécule adaptatrice de la clathrine AP-2 et contribue à l'endocytose du TCR après son engagement. En absence de DENND1b, un retard d'endocytose est observé et est associé à une augmentation de la signalisation et des risques d'allergie chez l'homme et la souris (C.-W. Yang et al., 2016).

T Jurkat dont l'expression de la sortin-nexin 17 a été éteinte (Osborne et al., 2015). Par ailleurs, il a récemment été montré que Rab35 régule le transport d'endosomes contenant différentes molécules de la polarité apico-basale (Crumbs, aPKC, CDC42) dans les cellules de rein MDCK (Klinkert et al., 2016). De plus, la régulation spatio-temporelle de Rab35 par ses GAP et GEF contribue à la biogénèse des endosomes et ainsi à la régulation du transport approprié de certains cargos comme le CI-MPR (Cation-Independent Mannose Phosphate Receptor) (Cauvin et al., 2016). Enfin, la GEF DENND1B qui régule Rab35 est impliquée, dans les lymphocytes Th2, dans l'internalisation du TCR induite par sa propre activation (**Fig.1.3.9**). Cette GEF interagirait constitutivement avec l'adaptateur AP-2 α spécifiquement dans les lymphocytes Th2. La régulation de Rab35 par DENND1B serait importante pour la « downmodulation » du TCR dans les Th2 après activation (C.-W. Yang et al., 2016). Ainsi, en absence de DENND1B ou de Rab35 chez la souris, un retard d'internalisation du TCR est observé dans les conditions d'activation et est associé à une augmentation de la signalisation et à une hyperactivation Th2. Chez les patients portant des mutations de DENND1B, les mêmes défauts de downmodulation du TCR sont également observés dans la sous-population Th2 et induisent des formes précoces d'asthme et de désordres immunitaires. Rab35 se place ainsi comme un régulateur général du transport du TCR, impliqué à la fois dans le recyclage constitutif du TCR nécessaire à l'activation T mais aussi dans la régulation négative de la signalisation. Toutefois, l'extinction de l'expression de AP-2 α mais pas de Rab35 conduit à des défauts similaires pour les cellules Th1 suggérant que d'autres régulateurs collaborant avec les adaptateurs AP sont également impliqués (C.-W. Yang et al., 2016).

Le recyclage de cargos à la membrane plasmique requiert des étapes de fusion membranaire. De manière intéressante, le groupe d'Andrés Alcover a montré que le recyclage à la synapse immunologique requiert un complexe SNARE mettant en jeu la v-SNARE VAMP3 (Das et al., 2004) qui est également impliquée dans le recyclage de récepteurs (TfR et Glut4) dans les neurones (Galli et al., 1994). Le clivage de VAMP3 par la chaîne légère de la neurotoxine tétanique inhibe l'enrichissement du

TCR à la synapse (Das et al., 2004). En accord avec ces observations, il a été rapporté que VAMP3 interagirait avec Rab8 dans les lymphocytes T et il est proposé que VAMP3 participe aux événements de fusion à la synapse des endosomes TCR⁺ (Das et al., 2004; Finetti et al., 2015). Il n'est cependant pas exclu que VAMP3 soit nécessaire à des étapes intermédiaires précédant la fusion des cargos TCR à la membrane plasmique. Une analyse plus récente du transport du TCR menée par le même groupe propose que le recrutement et la fusion des cargos associés au TCR seraient dépendants de la synaptotagmine-7 (Soares et al., 2013a) qui est un senseur de calcium nécessaire aux événements de fusion dépendants du complexe SNARE VAMP7/Syntaxine-4/SNAP-23 (Martinez-Arca et al., 2003b; Rao et al., 2004a; Sander et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'augmentation du Ca²⁺ induit par la stimulation du TCR contribue au recyclage de récepteurs à la synapse.

Comme il a été souligné précédemment, l'internalisation du TCR en réponse à l'interaction pCMH est nécessaire à la régulation de la signalisation T (Martínez-Martín et al., 2011; Vardhana et al., 2010; C.-W. Yang et al., 2016). Cependant, la mise au point par le groupe de Ronald D. Vale de senseurs de la phosphorylation de CD3 ζ , a permis de mettre en évidence que la forme phosphorylée du TCR s'accumule dans des compartiments endosomaux et sont capables de recruter ZAP-70 (Yudushkin and Vale, 2010). Ces endosomes sont distincts des compartiments de dégradation LAMP1⁺. Il serait ainsi possible qu'une signalisation endosomale existe afin de transmettre, soutenir ou encore diversifier la signalisation dépendante du TCR. L'équipe de Francisco Sanchez-Madrid propose ainsi que le complexe TCR/CD3 internalisé interagit avec l'extrémité positive des microtubules en croissance *via* la molécule EB1 (End-Binding protein 1). EB-1 régulerait ainsi le transport de vésicules sub-synaptiques portant CD3 ζ et qui interagiraient avec des vésicules LAT⁺. (Martín-Cófreces et al., 2012). En absence d'EB1, le nombre et la dynamique des microclusters de CD3 ζ à la synapse sont altérés et l'interaction des vésicules CD3 ζ avec les vésicules LAT serait limitée. Ces défauts sont par ailleurs accompagnés de la diminution des phosphorylations de LAT et des molécules de signalisation en aval.

Pour visionner la vidéo, rendez-vous à cette adresse :

https://www.dropbox.com/s/rhe98lxcrtctyeg/Video_Supplementaire_1_3.AVI?dl=0

Vidéo 1.3. Recrutement de la fraction intracellulaire de LAT à la synapse immunologique.

Cellule T Jurkat exprimant LAT-GFP conjuguée avec une cellule B Raji pulsée avec du superantigène (Bonello et al., 2004).

Ainsi, il est proposé que le devenir du TCR à la synapse balance entre le transport vers des compartiments de dégradation (Vardhana et al., 2010; Varma et al., 2006) et la propagation du signal *via* des endosomes CD3 ζ compétents pour signaler et interagir avec LAT (Martín-Cófreces et al., 2012; Yudushkin and Vale, 2010). Les microtubules organiseraient ce trafic intracellulaire et pourraient optimiser la rencontre de différents composants de la cascade de signalisation en aval du TCR.

1.3.3.3. *Le transport intracellulaire de LAT*

Notre équipe a contribué à fournir les premières preuves d'un transport régulé de LAT à la synapse immune (Bonello et al., 2004). En effet, l'analyse de la localisation sub-cellulaire de LAT a montré que, comme le TCR ou p56^{Lck}, LAT est présent à la périphérie cellulaire et dans des compartiments Tfr⁺. Ceci est en accord avec le fait que LAT interagit aussi avec le Tfr à l'état de repos (Roncagalli et al., 2014) et suggère que LAT recycle également constitutivement. Ces compartiments intracellulaires comporteraient l'adaptine- γ (Brignatz et al., 2005) qui est également associée à des compartiments de recyclage. Par ailleurs, il a été rapporté que la palmylation de LAT contribue au ciblage de la molécule dans les rafts lipidiques (Bonello et al., 2004; Hundt et al., 2009; 2006; W. G. Zhang et al., 1998) et que l'absence de palmylation retient LAT dans l'appareil de Golgi (Hundt et al., 2009; Tanimura et al., 2006). Par ailleurs, la queue C terminale de LAT qui comporte les résidus tyrosines phosphorylables contribuerait également à sa localisation (Bonello et al., 2004) et sa troncation (LAT ^{Δ Ct}) conduirait à une augmentation de la localisation de LAT dans des compartiments de recyclage (Bonello et al., 2004). De plus, l'engagement du TCR conduit au recrutement du compartiment intracellulaire de LAT qui se polarise vers la synapse immunologique (**vidéo 1.3**). Cette polarisation très certainement dépendante du MTOC (Blanchard et al., 2002) est suivie de la redistribution de ces compartiments à la synapse immunologique. De plus, l'expression de LAT ^{Δ Ct} dans des cellules T JCAM2, qui sont déficientes en LAT, inhibe la polarisation du compartiment intracellulaire de LAT et sa redistribution à la synapse, possiblement parce que ce recrutement est dépendant d'un

premier signal induit par la fraction de LAT à la membrane plasmique (Bonello et al., 2004). Ainsi, basé sur des observations en microscopie à super résolution PALM (PhotoActivated Localization microscopy), il a été mis en évidence que des vésicules LAT sous-membranaires sont recrutées à la synapse immunologique (Purbhoo et al., 2010; Williamson et al., 2011), ce qui est en accord avec les observations en microscopie TIRF du groupe de Francesco Sanchez-Madrid (Martín-Cófreces et al., 2012). Ces vésicules sub-synaptiques, dont la mobilité est restreinte par la localisation des sites d'activation du TCR définis ZAP-70, réalisent des va-et-vient entre les microclusters GADS/SLP-76. Leur motilité est réduite lorsqu'elles entrent en contact avec ces microclusters, probablement dû à des interactions protéines-protéines (Purbhoo et al., 2010). Ces observations sont en désaccord avec les travaux de Mark M. Davis et Lawrence E. Samelson qui proposent que la propagation du signal induit par le TCR nécessite le regroupement d'îlots membranaires contenant le TCR ou LAT à la membrane plasmique (Lillemeier et al., 2010; 2006; Sherman et al., 2011). Ils proposent ainsi que la concaténation des îlots de TCR et des îlots de LAT suffirait à générer une signalisation nécessaire à une réponse T robuste (Balagopalan et al., 2013). Cependant, une analyse plus poussée réalisée par l'équipe de Katharina Gaus a montré que la phosphorylation de LAT prédominerait dans la fraction vésiculaire sub-synaptique plutôt qu'au niveau de clusters présents à la membrane plasmique (Williamson et al., 2011). Des expériences plus récentes menées par le laboratoire d'Andrés Alcover suggèrent que ces vésicules subsynaptiques portant LAT fusionnent à la membrane plasmique. Cette fusion nécessiterait l'intervention du senseur de calcium synaptotagmine-7 impliqué dans des événements de fusion membranaire (Soares et al., 2013a). Cela suggère que le recrutement terminal de LAT à partir de vésicules sub-synaptiques emploierait une machinerie similaire à celle utilisée par les vésicules de TCR. L'analyse en microscopie PALM montre que la fusion des vésicules TCR ζ et LAT dépendante de la synaptotagmine-7 contribue à l'établissement de nanoterritoires de signalisation où LAT et SLP-76 interagissent entre eux. En absence de la synaptotagmine-7, la taille et la forme de ces nanoterritoires sont altérées et ceux-ci sont plus distants les uns des autres. Cela conduit à une diminution de la

phosphorylation du TCR et de LAT. Dans les cellules primaires humaines, les altérations au niveau de la synapse sont accompagnées de défauts de signalisation (phosphorylation de ERK), d'expression du marqueur précoce d'activation CD69 et de la production d'IL-2 et d'IFN- γ (Soares et al., 2013a).

Bien que les observations expérimentales suggèrent que le trafic intracellulaire de LAT joue un rôle dans l'activation lymphocytaire T, la machinerie impliquée dans ce transport aux sites d'activation du TCR était mal définie lorsque j'ai débuté ma thèse. Des analyses par microscopie confocale avaient montré que la fraction intracellulaire de LAT est proche de Rab27a, Rab37 et VAMP7 (TI-VAMP) (Soares et al., 2013a). Il est cependant tout à fait envisageable qu'à l'instar des granules cytolytiques, des maturations/changements de compartiments s'opèrent avant le transport terminal des vésicules LAT à la synapse. Ainsi, le rôle fonctionnel de protéines de transport intracellulaire dans le transport de LAT et l'activation et la réponse lymphocytaire T a constitué l'enjeu principal de mon travail et d'une manière générale de la recherche menée par notre équipe.

1.3.4. La protéine VAMP7 (TI-VAMP)

A l'instar des granules cytotoxiques (de Saint Basile et al., 2010) ou du TCR (Das et al., 2004; Soares et al., 2013b), il est envisagé que des événements d'attachement/fusion des vésicules LAT soient nécessaires au recrutement de celles-ci aux sites d'activation du TCR. Les données générées par le groupe d'Andrés Alcover (et publiées de manière concomitante à celles de notre groupe (Larghi et al., 2013)) suggèrent en effet que la machinerie de fusion des protéines SNARES et notamment VAMP7 participent à la sécrétion des vésicules LAT à la synapse (Soares et al., 2013a). A mon arrivée dans l'équipe de Claire, cette hypothèse avait déjà été posée et j'ai ainsi eu l'opportunité de m'intéresser au rôle de VAMP7 dans la biologie du lymphocyte T CD4⁺. Dans cette partie je décrirai succinctement les éléments de

régulation associés à VAMP7 à l'échelle moléculaire et le rôle de VAMP7 dans la sécrétion des vésicules post-golgiennes.

VAMP7 ou TI-VAMP (Tetanus neurotoxin Insensitive-VAMP) est une SNARE vésiculaire de la famille des longines et est exprimée de manière ubiquitaire (Advani et al., 1998; Galli et al., 1998). Un certain nombre de fonctions cellulaires lui ont été attribuées. En effet, VAMP7 est impliquée dans la formation des membranes autophagosomales (K. Moreau et al., 2011), la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Fader et al., 2012), et la phagocytose dans les macrophages (Braun et al., 2004). De manière intéressante, VAMP7 joue un rôle important dans la sécrétion de vésicules exocytiques post-golgiennes de différents cargos comme le transporteur de glucose GLUT-4 (Williams and Pessin, 2008) et VSV-g dans les cellules HeLa (Danglot et al., 2010). Dans les neurones, VAMP7 joue un rôle important dans l'exocytose des vésicules synaptiques nécessaire à la croissance des axones et des neurites (Alberts et al., 2003; Gupton and Gertler, 2010; Martinez-Arca et al., 2000; 2001; Racchetti et al., 2010). *In vivo*, les souris VAMP7 KO sont viables mais leur cerveau présentent une masse diminuée et un troisième ventricule plus volumineux que dans les souris normales (Danglot et al., 2012). Ces défauts anatomiques sont accompagnés de comportements anxieux anormaux.

A l'instar des autres protéines v-SNARES de la même famille (Sec22b, Ykt6) VAMP7 porte un domaine longine dans sa partie N-terminale. Ce domaine contribue à la formation d'un complexe avec les t-SNAREs et ainsi à sa fonction fusogénique (Filippini et al., 2001; Rossi et al., 2004). Plusieurs t-SNAREs partenaires de VAMP7 ont été déterminés dans différents types cellulaires. Dans les cellules neuronales, la syntaxine-1 et SNAP-25 ont été proposée comme les partenaires de VAMP7 nécessaires à la fusion des cargos à la synapse (Alberts et al., 2003; Martinez-Arca et al., 2003a). Dans d'autres types cellulaires, la fusion des vésicules exocytiques nécessite l'interaction de VAMP7 avec le complexe t-SNARE syntaxin-4/SNAP-23 dans les fibroblastes (Martinez-Arca et al., 2003a; Rao et al., 2004b) et dans les

mastocytes humains (Sander et al., 2008) ou avec le complexe syntaxin-3/SNAP23 dans la lignée de cellule épithéliale Caco-2 (Galli et al., 1998)

Par ailleurs, le domaine longine de VAMP7 lui permet d'interagir avec différents adaptateurs dont VARP, Hrb et AP-3 qui ont été mis en évidence par l'équipe de Thierry Galli à l'aide d'une approche par criblage double hybride (Burgo et al., 2009; Chaineau et al., 2008; Martinez-Arca et al., 2003b). Ces adaptateurs sont importants pour la régulation à la fois de l'activité fusogénique de VAMP7 mais aussi pour sa localisation subcellulaire.

VARP (Vps9 domain and Ankyrin repeats containing protein), qui est également une protéine que nous avons étudié, est une GEF de la petite GTPase Rab21 et interagit avec cette Rab par son domaine Vps9 (X. Zhang et al., 2006). VARP est également une protéine effectrice des petites GTPases Rab32 et Rab38 dont l'interaction réside dans le domaine Ankyrin (Ohbayashi et al., 2012; Tamura et al., 2009; F. Wang et al., 2008). Les travaux du groupe de Thierry Galli ont montré par ailleurs, que VARP interagit avec le domaine longine de VAMP7 (Burgo et al., 2009). Ainsi, VARP, Rab21 et VAMP7 sont co-transportées dans les vésicules axonales. L'absence de VARP phénotype la diminution de la croissance des neurites observés en absence de VAMP7. A l'inverse, l'expression d'une forme hyperactive de Rab21 (Q78L) augmente la croissance des neurites (Burgo et al., 2009). De plus, la colocalisation de VAMP7/Rab21 au niveau du corps cellulaire des neurones est perdue en absence de VARP, suggérant que les protéines VAMP7, VARP et Rab21 forment un complexe nécessaire au transport des vésicules exocytiques (Burgo et al., 2009). Un travail intensif de l'analyse des interactions protéiques établies par VARP dans les cellules neuronales a permis d'établir un réseau moléculaire coordonnant différents acteurs du transport intracellulaire nécessaires à la sécrétion des vésicules pré-synaptiques VAMP7⁺ au niveau du cône axonale (Burgo et al., 2012) (**Fig. 1.3.10**). En effet, VARP interagirait au niveau du TGN avec la golgine-A4 (p230/golgin-245/GOGA4) qui elle-même interagit avec la protéine MACF1 (Burgo et al., 2012), un effecteur de Rab21 qui coordonne les cytosquelettes d'actine et de microtubules

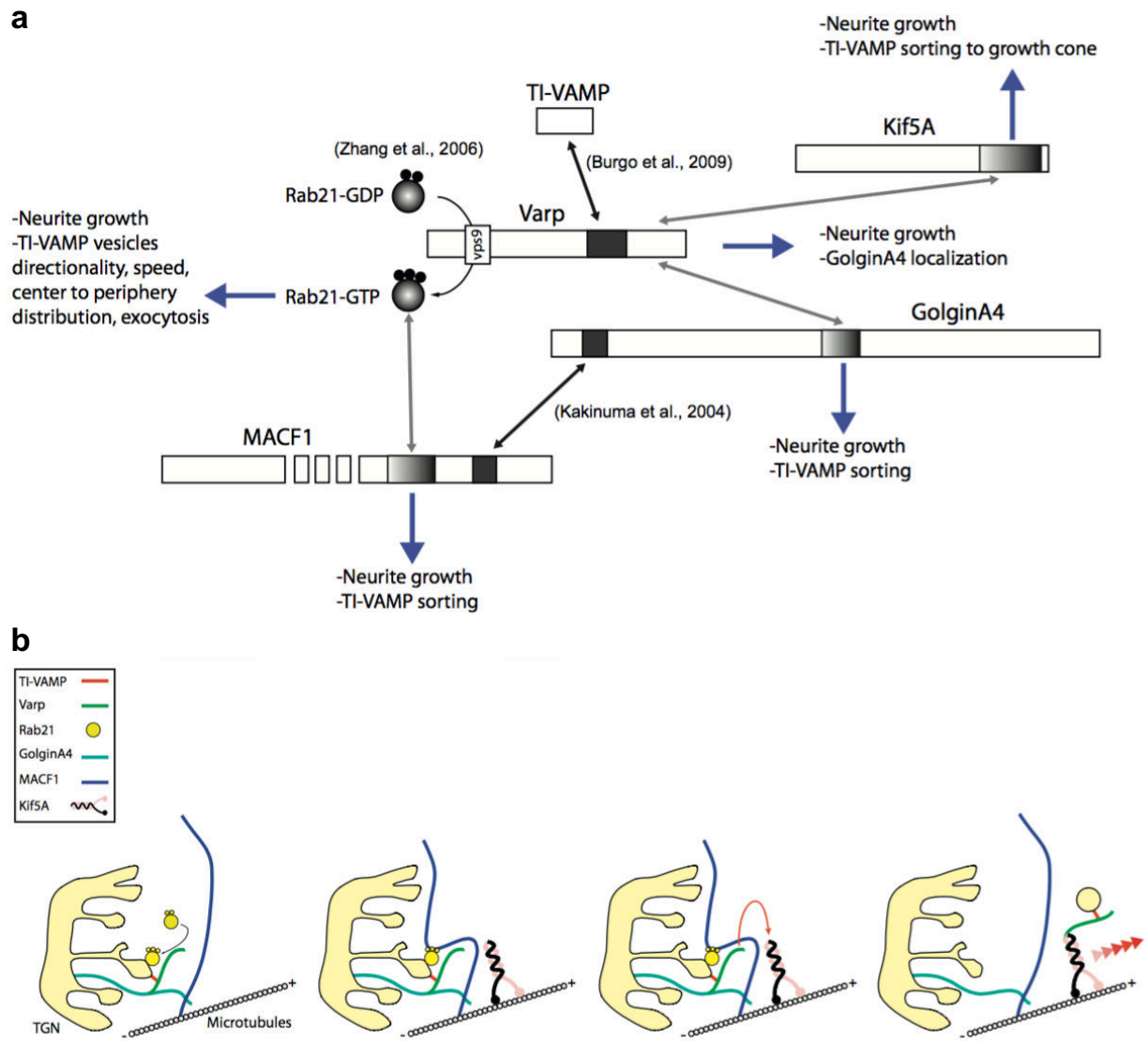


Figure 1.3.10. Modèle du transport de cargos VAMP7⁺ depuis le Golgi vers la périphérie neuronale.

(a) Réseau moléculaire impliqué dans le transport des cargos VAMP7. (b) Modèle proposé pour le tri des cargos VAMP7 : par son interaction avec VAMP7 et d'autres acteurs moléculaires, VARP joue un rôle central dans le transport des cargos VAMP7 vers la périphérie neuronale. VARP est une GEF de Rab21 dont l'effecteur MACF1 coordonne les cytosquelettes d'actine et de microtubules. VARP et MACF1 interagissent également avec la golgine-A4 et ce réseau moléculaire serait impliqué dans la sortie des cargos VAMP7 depuis le TGN. Par son interaction avec la kinésine-1 (Kif5A), VARP participerait au transport des cargos vers la périphérie. Adapté de (Burgo et al., 2012).

(Kakinuma et al., 2004). En absence de la golgine-A4 ou de MACF1, les vésicules VAMP7⁺ ne sont pas transportées depuis l'appareil de Golgi suggérant que ces effecteurs sont impliqués dans le tri/le bourgeonnement de ces vésicules depuis le TGN. Par ailleurs, VARP se lie également à la chaîne lourde de la kinésine-1 (Kif5A), qui est également nécessaire au transport des vésicules VAMP7 sur le cytosquelette de microtubule et la croissance axonale. Ainsi, VARP jouerait un rôle important dans la reconnaissance des cargos VAMP7 au TGN et régulerait par ses interactions multiples le transport des vésicules VAMP7 formées au TGN vers la périphérie cellulaire (Burgo et al., 2012; 2009) (**Fig.1.3.10**).

Par ailleurs, VAMP7 régule son activité fusogénique au cours de son transport afin d'éviter des événements de fusion non spécifiques. Il a en effet été proposé que VAMP7 soit impliquée dans la formation de complexe SNARE inactif (Kent et al., 2012). D'autres études proposent que VAMP7 adopte une conformation fermée régulant ainsi ses capacités fusogéniques (Vivona et al., 2010). VARP contribuerait à maintenir cette conformation fermée fusogéniquement inactive (Schäfer et al., 2012).

La protéine Hrb constitue un autre adaptateur interagissant avec le domaine longine de VAMP7 (Chaineau et al., 2008). L'inhibition de l'expression de Hrb dans différents types cellulaires a permis de montrer que cet adaptateur est impliqué dans l'internalisation de VAMP7 et serait associé à la clathrine (Chaineau et al., 2008; Pryor et al., 2008). Par ailleurs, l'adaptateur CALM (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia protein) participerait également à l'endocytose de VAMP7 et au recyclage des protéines VAMP post-Golgiennes depuis la membrane plasmique (Sahlender et al., 2013).

Quel est le devenir des cargos VAMP7 ayant été endocytés ? Il est proposé qu'un troisième adaptateur, AP-3 soit impliqué dans le tri de VAMP7 depuis les endosomes de tri vers les endosomes tardifs et les lysosomes (Kent et al., 2012). Il a ainsi été montré dans différents modèles que VAMP7 présentent au niveau de ces organelles différentes fonctions comme la sécrétion lysosomale des granules cytotoxiques dans les cellules NK (Krzewski et al., 2011) ou la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes (Pryor et al., 2004). Il est enfin notable que l'expression

d'une forme mutée de AP-3 incapable d'interagir avec VAMP7 induit un défaut de tri de ce cargo qui poursuit un transport rétrograde vers le TGN au lieu d'être ciblé vers les compartiments endosomaux tardifs (Kent et al., 2012).

1.3.5. Les protéines Rab6

Au cours de ma thèse, la majeure partie de mon travail a porté sur les petites GTPases Rab6. Rab6 constitue une famille de trois petites GTPases qui sont homologues de la famille de protéines YPT chez la levure (Zahraoui et al., 1989). Ces trois isoformes Rab6a, Rab6a' et Rab6b sont exprimés chez l'homme et la souris (D. Chen et al., 1997; Echard et al., 2000; Opdam et al., 2000). Rab6b, qui est encodée par un gène indépendant, est exprimée exclusivement dans le cerveau. Rab6b présente 91% d'homologie avec Rab6a et les deux ont des effecteurs communs mais leurs propriétés de liaison au GTP sont sensiblement différentes (Opdam et al., 2000). A l'inverse Rab6a et Rab6a' (ou Rab6c) proviennent d'épissages alternatifs et sont exprimées ubiquitairement. Rab6a et Rab6a' diffèrent par 3 acides aminés proches de la région de liaison au GTP mais leurs propriétés de liaison à ce nucléotide sont tout à fait similaires (Echard et al., 2000). La famille des petites GTPases Rab6 avait d'abord été décrite dans les citernes médiales et trans de l'appareil de Golgi (Goud et al., 1990). L'analyse plus précise a permis de mettre en évidence que Rab6 est présente dans le TGN ainsi que dans des vésicules indépendantes proposées comme étant des vésicules post-Golgi (Antony et al., 1992). Ainsi, la localisation de Rab6 est altérée par le traitement des cellules par la Brefeldine-A (BFA) qui redistribue l'appareil de Golgi dans la cellule (Roa et al., 1993). L'expression dans des cellules des formes dominantes négatives (T22N) ou hyperactive (Q72L) de Rab6a et Rab6a' ou encore l'extinction spécifique de l'expression de ces isoformes a démontré que les deux isoformes de Rab6 présentent des rôles différents (Del Nery et al., 2006; Echard et al., 2000). La détermination des protéines effectrices qui s'associent à Rab6a/a' a considérablement contribué à la compréhension des fonctions de Rab6. Ainsi,

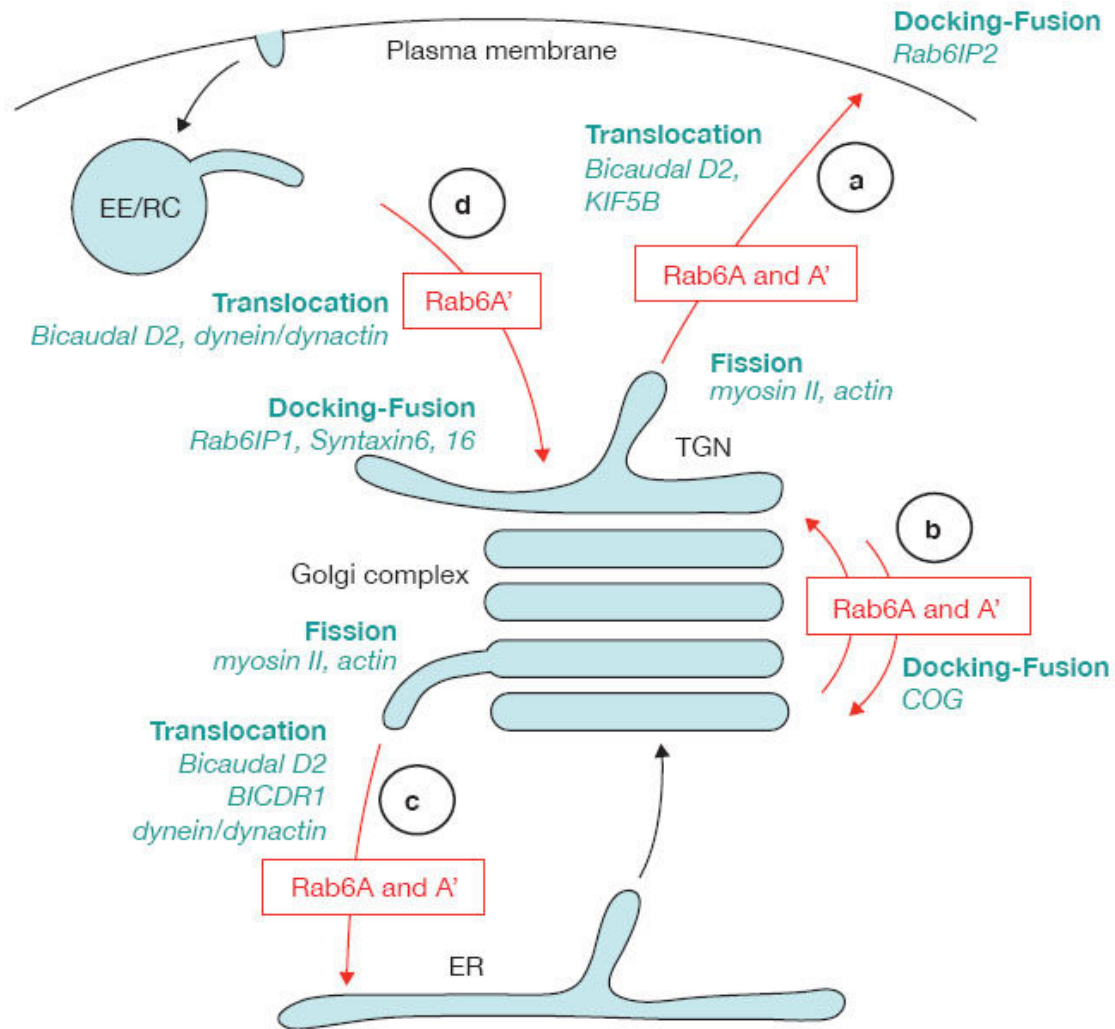


Figure 1.3.11. Fonctions de Rab6 dans le trafic intracellulaire.

(a) Rab6a/a' sont impliquées dans le transport depuis le TGN vers la membrane plasmique par leur interaction avec la myosine-II qui induit la fission des vésicules depuis le TGN. La kinésine KIF5B est également régulée par l'intermédiaire de l'adaptateur Bicaudal D2 et permet un transport des cargos *via* les microtubules vers la périphérie cellulaire où l'effecteur Rab6IP2 participe à l'arrimage/fusion des cargos. (b-c) Rab6a/a' régulent le transport entre les saccules de Golgi, ainsi que le transport rétrograde indépendant de COP-I entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. (d) Rab6a' régule le transport rétrograde de cargos endocytiques vers le Golgi où cette petite GTPase participe à l'arrimage/fusion des cargos (Valente et al., 2010).

diverses approches génétiques (Y2H) ou en biochimie (co-immunoprécipitation) ont permis de mettre en évidence ces effecteurs dont l'un des premiers a été le moteur moléculaire KIF20A (rabkinésine-6 ou KIFL) (Echard et al., 1998) qui s'associe à Rab6a mais pas à Rab6a' (Del Nery et al., 2006; Echard et al., 2000) et est impliqué dans la cytokinèse (Fontijn et al., 2001; Hill et al., 2000; Neef et al., 2003). D'autres fonctions importantes associées à différents effecteurs (moteurs moléculaires de la famille des kinésines, dynéines, myosines, des golgines et un certain nombre d'adaptateurs) ont par la suite été attribuées à cette famille de petite GTPase. Par exemple, Rab6 est impliquée dans la régulation de la structure de l'appareil de Golgi et les transports antérogrades et rétrogrades entre les citernes de Golgi (P. L. Lee et al., 2015; Martinez et al., 1994; Mayer et al., 1996; Starr et al., 2010) (**Fig.1.3.11b**). Notamment, l'expression de la forme hyperactive de Rab6 (Q72L) induit un ralentissement de la sécrétion des molécules de CMH de classe-II néosynthétisées dans les lymphocytes B de souris et cela est associé à des défauts de présentation antigénique (Briken et al., 1997). Rab6 semble aussi jouer un rôle dans le transport de MR1, une autre molécule impliquée dans la présentation d'antigène (Harriff et al., 2016). Enfin, Rab6 a également été associée au transport rétrograde entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique indépendant de COP-I (Jeong et al., 2012; Matsuto et al., 2015; Sengupta et al., 2015; White et al., 1999) (**Fig.1.3.11c**).

De manière très intéressante, un nombre croissant de publications a permis de définir différentes fonctions des isoformes Rab6 au carrefour entre le recyclage et la sécrétion de différents cargos (**Fig.1.3.11a,d**). Plus précisément, Rab6 joue un rôle important dans le transport rétrograde de certains cargos entre les endosomes et le TGN. D'autre part, Rab6 est impliquée dans la sécrétion de cargos à partir du TGN. Or, comme cela a été suggéré dans la **partie 1.3.3.3**, la fraction intracellulaire de LAT serait contenue dans des endosomes de recyclage à l'état de repos et serait sécrétée à la synapse immunologique en réponse à une stimulation du TCR. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que Rab6 pourrait jouer un rôle central dans le transport de LAT à l'interface entre recyclage et sécrétion. Je m'emploierai donc à définir les acteurs majeurs impliqués dans les voies de sécrétion et les voies de transport rétrograde

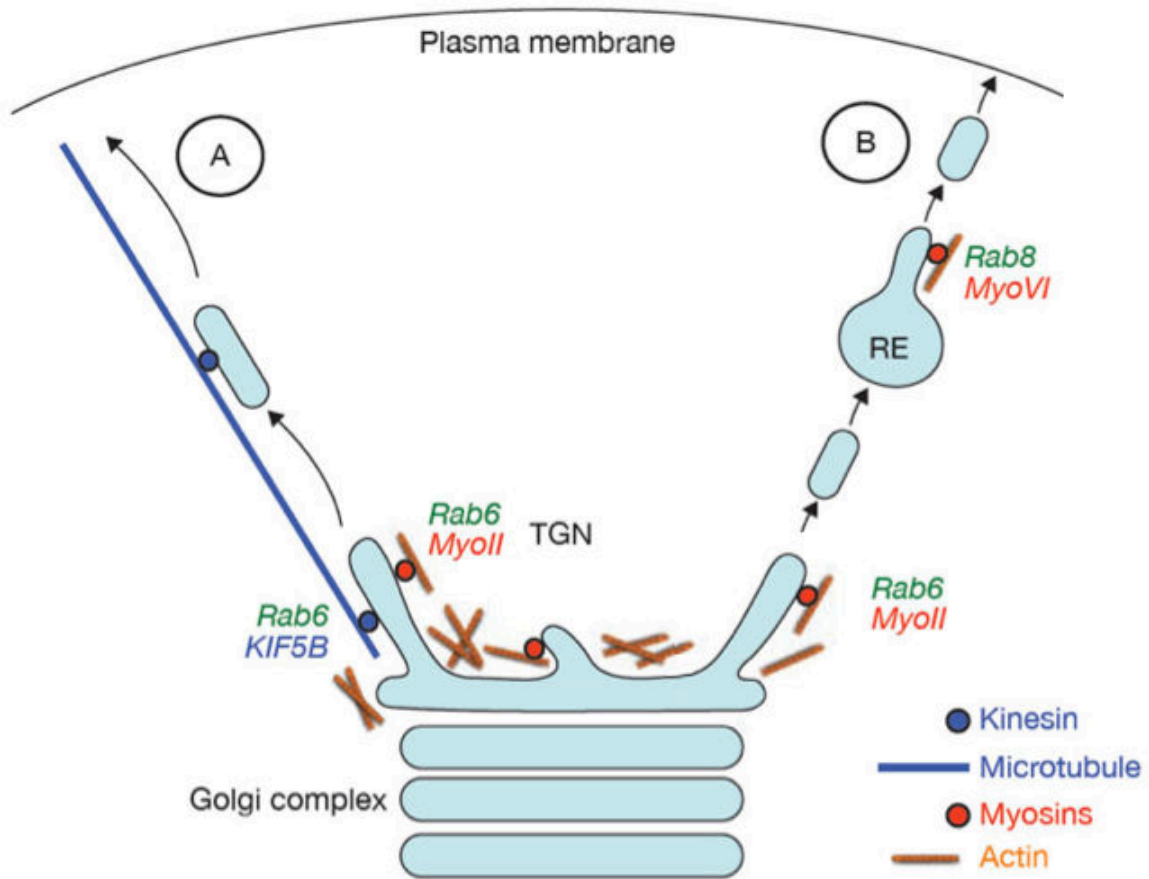


Figure 1.3.12. Rôle des moteurs moléculaires myosine-II et KIF5B dans l'export des vésicules exocytiques depuis le TGN.

La myosine-II est un effecteur de Rab6 permettant la fission induite par l'actine des cargos exocytiques depuis le TGN, et ainsi leur transport vers la périphérie. Les vésicules, ainsi individualisées, peuvent être transportées directement à la membrane plasmique par la kinésine KIF5B qui interagit avec Rab6 via BICD2 (A) ou bien être transportées à la périphérie indirectement via les endosomes de recyclage (B, RE) (Valente et al., 2010).

(endosomes vers Golgi) dépendantes de Rab6 et ne décrirai pas ici les rôles de Rab6 dans le transport intra-Golgien ou le transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique.

1.3.5.1. Implications de Rab6 dans les voies de sécrétion (transport antérograde)

Le rôle de Rab6 dans la voie exocytique a été clairement établi dans différents types cellulaires. En effet, la famille des petites GTPases Rab6 est non seulement présente au niveau du TGN, des citernes de l'appareil de Golgi et dans des cargos de transport rétrograde entre le Golgi et le réticulum, mais aussi dans des vésicules post-golgiennes portant des molécules destinées à être sécrétées (VSV-g et NPY, neuropeptide Y) (Del Nery et al., 2006; Grigoriev et al., 2007; White et al., 1999). Notamment, Rab6 a été associée au transport vers la périphérie cellulaire des cargos de rhodopsine dans les cellules photoréceptrices de rétine (Deretic, 1998; Deretic and Papermaster, 1993) ou des glycoprotéines d'enveloppe nécessaires à la formation de HSV1 (Johns et al., 2014). Différentes études ont par la suite montré que Rab6 est requise à différentes étapes de la voie exocytique entre le TGN et la membrane plasmique, à savoir le *i.* bourgeonnement/fission des vésicules au TGN, *ii.* le transport des vésicules exocytiques *via* les microtubules, et *iii.* l'arrimage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique.

Rab6 et le bourgeonnement/fission de cargos exocytiques au sortir du TGN

Il a été proposé que Rab6 fait partie d'un complexe p62/TGN38/41 au niveau du TGN et participerait au bourgeonnement de vésicules exocytiques dépendant de PI3-K (Jones et al., 1993; Jones and Howell, 1997). Ces bourgeons sont le site d'accumulation d'actine et leur fission est dépendante de la myosine-II qui est un effecteur de Rab6a/a' (Miserey-Lenkei et al., 2010) (**figure 1.3.12**). En effet, l'extinction

de l'expression de Rab6a/a', ou bien l'inhibition de la myosine-II avec de la blebbistatine provoquent dans les cellules HeLa, la formation de tubules émanant du Golgi. Il est ainsi proposé que la myosine-II, dont la localisation au Golgi est dépendante de Rab6a/a', serait nécessaire à l'étirement des membranes ainsi qu'à leur fission. Une autre étude menée également dans les cellules HeLa a montré que les cargos Rab6⁺ VSV-g⁺ post-Golgi ne sont pas altérés par l'inhibition de la myosine-II. Cela suggère que les cargos exocytiques sont hétérogènes ou bien que d'autres facteurs peuvent être impliqués dans la fission de cargos Rab6 au sortir du Golgi (Wakana et al., 2012). Il est ainsi notable que l'inhibition de la myosine Va, qui est également une molécule effectrice de Rab6a/a', présente un phénotype similaire à l'inhibition de la myosine-II (Lindsay et al., 2013). Par ailleurs, il a également été proposé que le transport depuis le TGN est régulé par la famille des golgines et notamment des golgine-97 et golgine-A4 qui sont des effecteurs de Rab6 (Barr, 1999; Gillingham et al., 2014). Ainsi, dans les cellules HeLa, la golgine-97 mais pas la golgine-A4 colocalise avec les tubules de E-cadherine en partance du TGN et l'extinction de l'expression de cette golgine conduit à une diminution de la sécrétion de ce cargo (Lock et al., 2005). L'analyse de la localisation de la golgine-A4 dans les cellules HeLa et dans une lignée de macrophages de souris (RAW 264.7) montre que cette golgine est plutôt associée aux tubules contenant la cytokine inflammatoire TNF α (Tumor Necrosis Factor- α) (Lock et al., 2005; Micaroni et al., 2013). Dans les macrophages, l'extinction de l'expression de Rab6a/a' conduit à la délocalisation de la golgine-A4 et est associée à un défaut du transport du TNF- α depuis le Golgi (Micaroni et al., 2013).

Rab6 et le transport dépendant des microtubules

Le transport des vésicules exocytiques issues du TGN vers la périphérie cellulaire a également été associé à Rab6. En effet, en absence de Rab6a/a', la processivité des vésicules VSV-g ou NPY transportées vers l'extrémité positive des microtubules est fortement altérée (Grigoriev et al., 2007). Il a ainsi été déterminé que Rab6 interagit avec la chaîne lourde de la kinésine-1 (KIF5B) par l'intermédiaire de l'adaptateur BICD2 (Bicaucal-D2) (**figure 1.3.11,12**). L'extinction de l'expression de

KIF5B phénocopie l'absence de Rab6 dans les cellules HeLa. Cependant, en absence de Rab6a/a' ou de KIF5B, le transport vers la périphérie n'est pas aboli suggérant que d'autres protéines de transport sont impliquées ou peuvent compenser la perte de leur expression. Par ailleurs, ces vésicules exocytiques présentent des mouvements bidirectionnels suggérant que leur mouvement dépend à la fois de kinésines mais aussi de dynéines. Il a notamment été montré que DYNLRB1 appartenant à la famille des chaînes légères des dynéines interagit avec les trois isoformes de Rab6 (Wanschers et al., 2008). DYNLRB1 est principalement localisée au Golgi mais est également associée à des membranes en dehors du Golgi. Dans les cellules neuronales et les cellules de rein, Rab6a et Rab6b interagissent avec BICDR-1 (Bicaudal-D-related protein 1) qui présente une séquence homologue à BICD1 et BICD2 (Schlager et al., 2010). BICDR1 relie les cargos exocytiques NPY⁺ avec le complexe dynéine/dynactine. Ces cargos suivent ainsi un transport vers l'extrémité négative des microtubules et se retrouvent ainsi concentrés autour du centrosome. L'intensité de l'expression de BICDR1 est directement liée à ce transport vers le centrosome et contribuerait à séquestrer cette fraction de vésicules Rab6⁺ dans les neurones immatures et à inhiber la croissance des neurites. Dans les neurones plus matures, l'expression de BICDR1 serait fortement diminuée permettant un transport antérograde des cargos. Cette étude propose également que ce transport antérograde soit dépendant de la kinésine KIF1C qui se lie à BICDR1 et qui se trouve également concentré dans la région péricentrosomale. Rab6, qui interagit également avec la kinésine KIF1C (P. L. Lee et al., 2015), participerait ainsi dans certains types cellulaires à la balance entre un transport rétrograde et un transport antérograde nécessaire à la sécrétion de cargos.

Rab6 et l'arrimage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique

L'analyse par microscopie TIRF de cellules HeLa a permis de caractériser le comportement des vésicules exocytiques Rab6⁺ à proximité de la membrane plasmique (Grigoriev et al., 2007). Les observations ainsi faites suggèrent que les

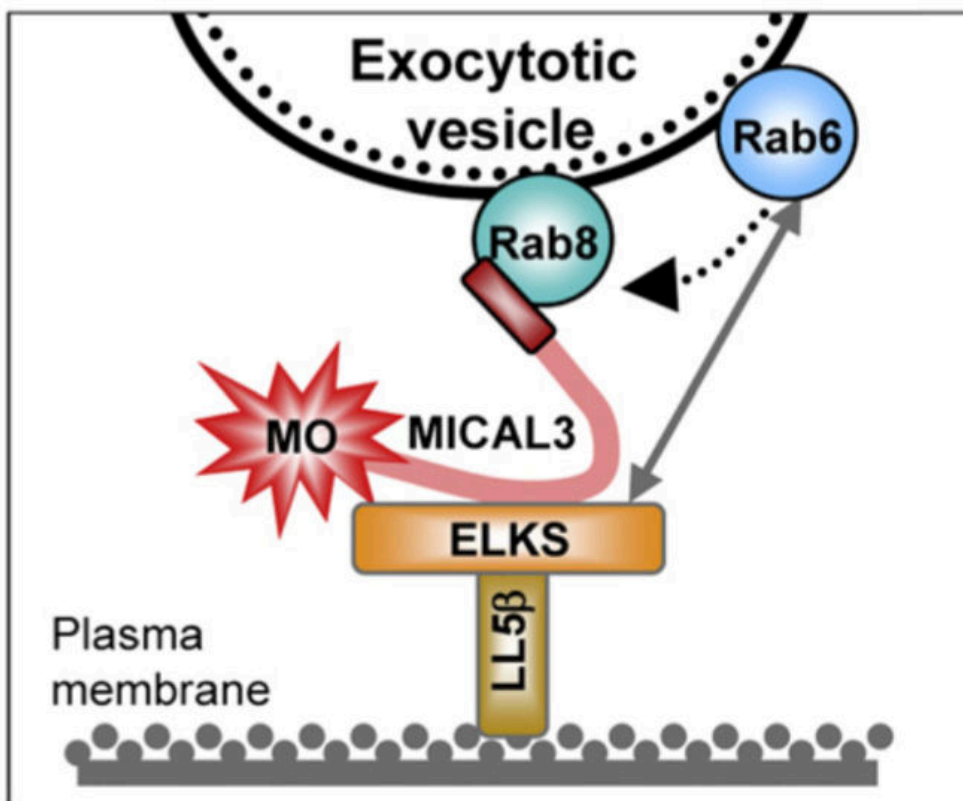


Figure 1.3.13. Fonction de fusion de cargos exocytiques impliquant l'effecteur de Rab6, ELKS (Rab6IP2).
 L'effecteur ELKS ou Rab6IP2 interagit avec l'adaptateur MICAL3 qui se lie également à Rab8. Ce complexe moléculaire permet l'arrimage/fusion des vésicules exocytiques à la membrane plasmique (Grigoriev et al., 2011a).

vésicules s'immobilisent puis fusionnent à la membrane plasmique. La protéine Rab6IP2 (ELKS, ERC) (Deguchi-Tawarada et al., 2004; Monier et al., 2002) qui interagit avec Rab6a/a' joue un rôle important dans l'arrimage/fusion de ces vésicules à la membrane plasmique. En effet, l'inhibition de l'expression de Rab6IP2 conduit à une accumulation des vésicules exocytiques à la périphérie cellulaire (Grigoriev et al., 2007). Les vésicules y sont plus mobiles que lorsque Rab6IP2 est exprimée suggérant que cet effecteur de Rab6 joue un rôle dans l'arrimage des vésicules à la membrane. Par ailleurs, la petite GTPase Rab8a contribuerait de manière significative à cet arrimage. En effet, Rab6 recrute Rab8a au niveau des vésicules exocytiques (Grigoriev et al., 2011b; Shibata et al., 2016) et cette petite GTPase interagirait également avec ELKS à la périphérie cellulaire *via* l'adaptateur MICAL3 (**Fig.1.3.13**). Ainsi, en absence de Rab8a ou dans des cellules HeLa exprimant différentes formes mutées de MICAL3, les vésicules exocytiques présentent des défauts d'arrimage et de fusion à la membrane plasmique.

1.3.5.2. Le transport rétrograde entre les endosomes et le TGN

Le flux membranaire depuis le réticulum endoplasmique vers la périphérie cellulaire en passant par l'appareil de Golgi est contrebalancé par un flux de cargos depuis la membrane plasmique vers les endosomes. Il est décrit « classiquement » que les molécules internalisées depuis la membrane plasmique se retrouvent dans des endosomes de tri (Rab5⁺) et transitent vers des endosomes tardifs (Rab7/Rab9⁺) pour être dégradées dans les lysosomes qui contiennent notamment des hydrolases. Alternativement, ces molécules peuvent être recyclées à la membrane plasmique de manière rapide via des cargos Rab4⁺ ou bien de manière plus lente par des compartiments péricentrosomaux Rab11⁺. Cependant, ce schéma *a priori* simple, où les compartiments de sécrétion (TGN) sont séparés des compartiments de dégradation et de recyclage, a été compliqué par diverses observations. Notamment, il a été observé qu'un certain nombre de molécules suivent une voie rétrograde depuis

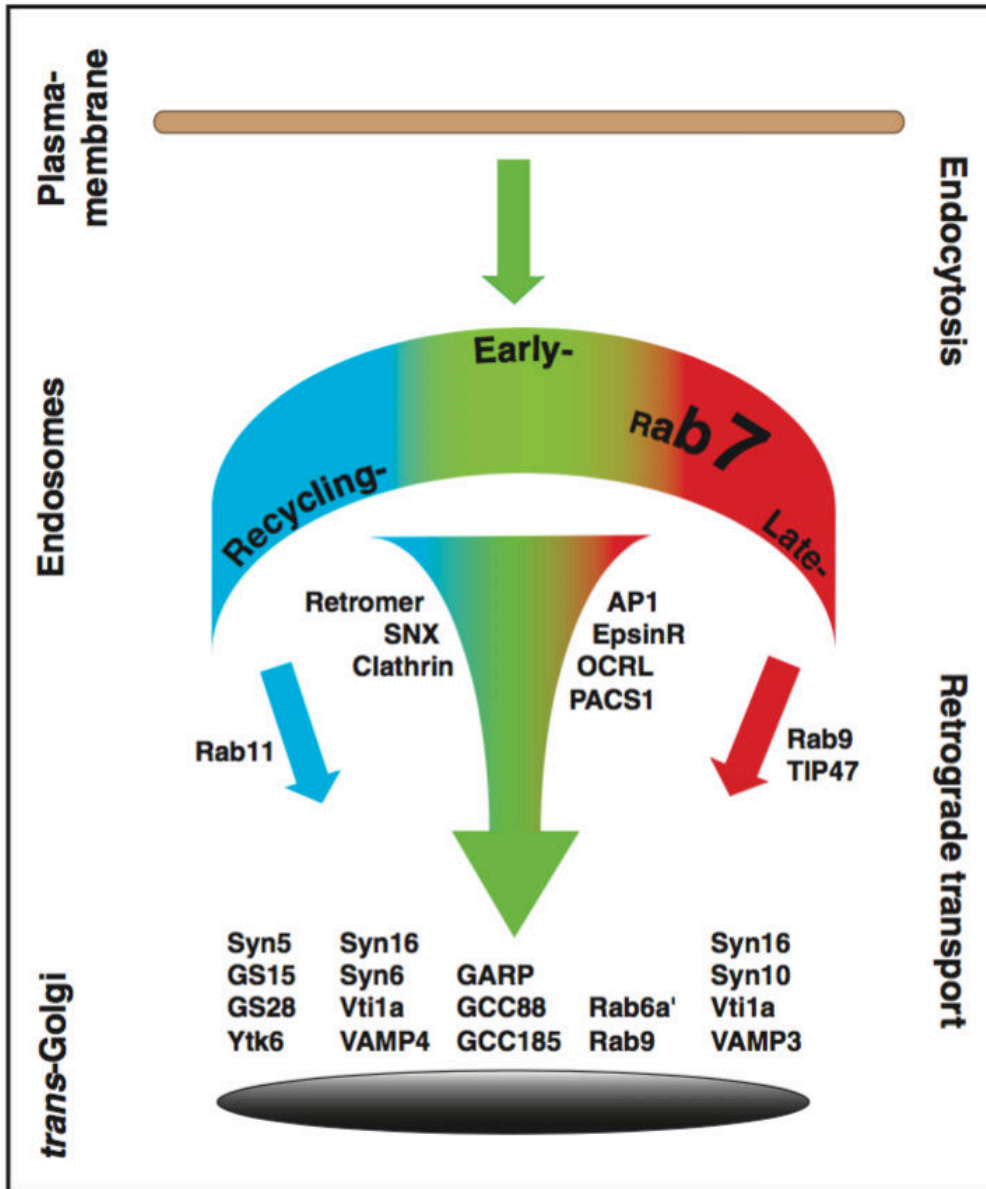


Figure 1.3.14. Voies de transport rétrograde depuis les différents compartiments endocytiques vers le TGN. De multiples acteurs moléculaires sont impliqués dans le tri des cargos endocytiques, le transport depuis les différents compartiments endosomaux (précoces, de recyclage et tardifs), et l'arrimage/fusion des cargos rétrogrades au TGN (Johannes and Wunder, 2011a).

les endosomes vers le TGN. En effet, les premières preuves d'un tel transport rétrograde ont été apportées dans les années 70, par l'étude du transport de la ricine, une toxine d'origine végétale qui est internalisée et transportée *via* l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique où elle inhibe la synthèse protéique (Gonatas et al., 1975; Montanaro et al., 1973). Par la suite, il a été démontré que d'autres toxines d'origine extracellulaire comme les toxines bactériennes Shiga (Sandvig et al., 1992) ou du choléra (Ganley et al., 2008) suivent des voies de transport similaires. De manière intéressante, il a été observé depuis plus d'une vingtaine d'années que des molécules endogènes comme les récepteurs au mannose-6-phosphate (MPRs) ou encore les molécules TGN38/41 (Ghosh et al., 1998; Stanley and Howell, 1993) empruntent aussi des voies de transport rétrogrades et cyclent entre la membrane plasmique et l'appareil de Golgi.

Depuis, plusieurs voies rétrogrades qui émergent des différents types d'endosomes (endosomes précoces, tardifs et de recyclage) ont beaucoup été discutées (Bonifacino and Hurley, 2008; Bonifacino and Rojas, 2006a; Johannes and Popoff, 2008; Johannes and Wunder, 2011b; Pfeffer, 2011). Elles utilisent des machineries qui emploient certains effecteurs communs dont Rab6 (**Fig.1.3.11**). Je décrirai ici les deux/trois voies décrites issues de l'arborescence endosomale (**Fig. 1.3.14**) et je commenterai les acteurs majeurs régulant l'entrée des cargos rétrogrades au TGN. Par ailleurs, dans la mesure où la destination finale de certains cargos n'est pas nécessairement le TGN et que le transport rétrograde constitue un ensemble d'évènements très dynamique, il apparaît *a priori* difficile d'en définir les acteurs moléculaires. Je soulignerai ainsi quelques techniques qui ont permis d'y parvenir.

Transports depuis les endosomes tardifs : exemple des récepteurs au mannose-6-phosphate

Les MPRs (« cation-dépendent », CD-MPR ou « cation-indépendent », CI-MPR) constituent les premiers cargos dont la régulation du transport rétrograde vers le TGN a été relativement bien étudiée (Duncan and Kornfeld, 1988). Les MPRs permettent le transport depuis le TGN d'enzymes néosynthétisées de type hydrolase vers les

endosomes précoces et tardifs (Geuze et al., 1988; Waguri et al., 2003) qui mûrissent vers des compartiments lysosomaux de dégradation. Les MPRs, échappant à cette dégradation en recyclant vers le TGN, présentent un trafic régulé par différents acteurs. Afin d'étudier le transport rétrograde des MPRs, le groupe de Suzanne Pfeffer a utilisé dans les années 90, des cellules semi-intactes mises en présence de fractions de Golgi et de MPRs radiomarquées (Lombardi et al., 1993). L'analyse de la glycosylation de ces MPRs qui a lieu dans l'appareil de Golgi a permis de confirmer que les MPRs recyclent *via* cette organelle et que la protéine Rab9 et non Rab7 est impliquée dans ce processus. De plus, l'expression d'une forme dominante négative de Rab9 (S21N) dans les cellules montre des défauts de modification post-traductionnelles dépendantes du Golgi de ces MPRs ainsi que des défauts de maturation des protéines lysosomales (Riederer et al., 1994). Il a été par la suite déterminé par le même groupe que Rab9-GTP permet le recrutement de la protéine TIP47 aux membranes endosomales (Díaz and Pfeffer, 1998). Une des propriétés importantes de TIP47 est de se lier à la queue cytosolique des MPRs. Ainsi, l'interférence avec TIP47 par l'utilisation d'anticorps bloquant dans un système de reconstitution du transport rétrograde ou bien avec des ARNi montre un défaut de transport des MPRs au Golgi (Carroll et al., 2001; Díaz and Pfeffer, 1998).

Transports depuis les endosomes de tri

Le fragment B de la toxine Shiga (STxB) a également constitué un outil intéressant pour le transport depuis les endosomes de tri ou de recyclage. En effet, l'analyse de la localisation de STxB après internalisation montre que cette toxine transite par des compartiments TfR⁺ TGN38⁺ ne présentant pas les MPRs. Cela suggère que plusieurs voies de transport rétrograde coexistent (Mallard et al., 1998). Dans cette étude, le transport rétrograde a été analysé à l'aide d'une STxB modifiée portant deux résidus ciblés par la sulfotransférase qui est une enzyme résidente du Golgi. La compréhension des mécanismes impliqués dans le tri des cargos rétrogrades à partir des endosomes précoces et de recyclage a poussé plusieurs laboratoires à étudier la clathrine et ses molécules associées. Le groupe de Ludger

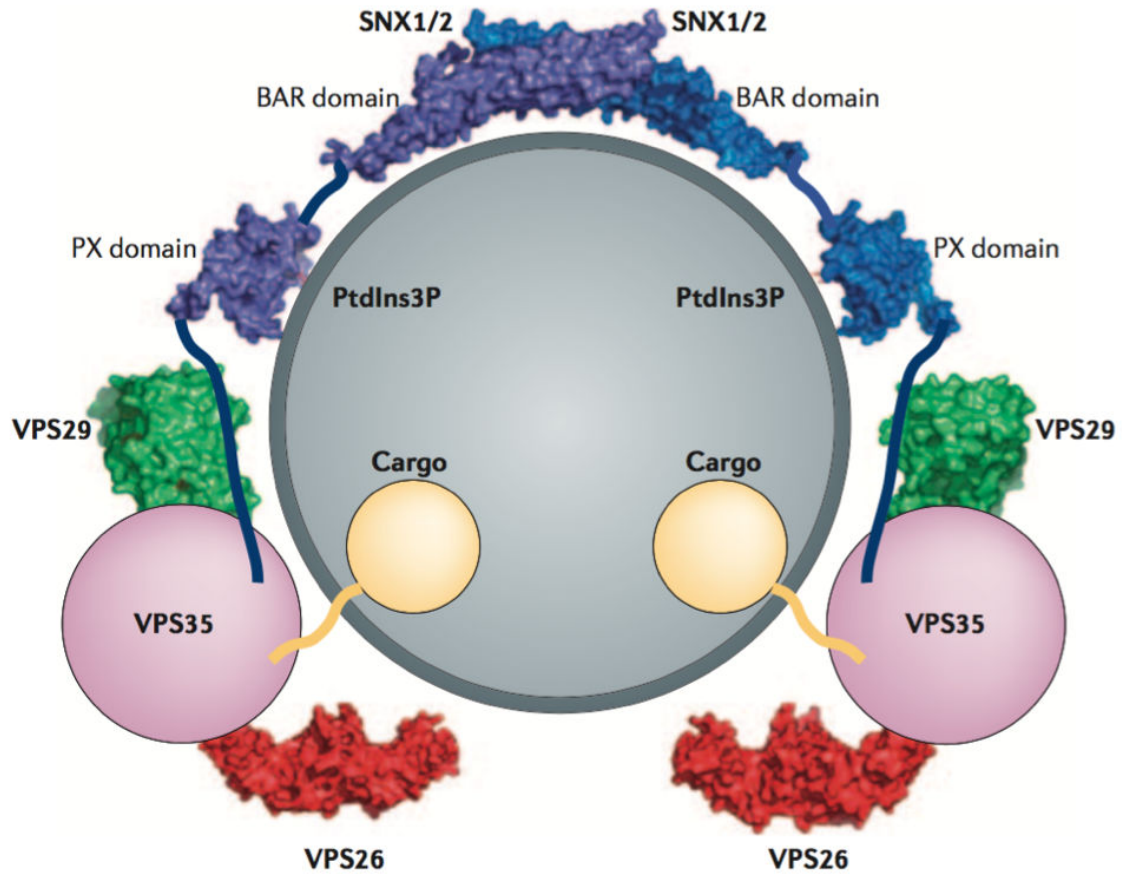


Figure 1.3.15. Modèle d'association du rétromère.

Le rétromère est composé de différentes sous-unités impliquées dans la tubulation des endosomes, ainsi que dans la reconnaissance et le tri des cargos. Les sorting-nexins 1/2 (SNX1/2) sont interchangeables et forment des hétérodimères ou des homodimères. Les SNX portent un domaine BAR sensible à la courbure des membranes, mais qui peut également induire l'élongation de ces membranes. Ces SNX1/2 interagissent avec le complexe Vps de reconnaissance des cargos composé de Vps26, Vps29, Vps35. Cette reconnaissance nécessite Vps35 qui se lie à des motifs de la queue cytoplasmique des cargos. (Bonifacino and Rojas, 2006b)

Johannes a notamment montré que l'inhibition de la clathrine et de sa molécule associée, l'epsinR, n'inhibe pas l'internalisation de la STxB. Elle induit cependant l'accumulation de la toxine dans des compartiments endosomaux TfR⁺, Rab4⁺ et à moindre mesure Rab11⁺ et EEA1⁺ (Saint-Pol et al., 2004), suggérant un rôle de la clathrine dans le tri des cargos à partir des endosomes précoces. Bien que l'epsinR interagisse avec l'adaptateur AP-1, qui est également associé à la clathrine, AP-1 n'influence pas le transport rétrograde de la STxB. Cependant, la mutation chez la souris de la sous-unité μ 1A de AP-1 altère fortement le transport de différents MPRs qui s'accumulent dans les endosomes et ne recyclent pas vers le TGN (Meyer et al., 2000). Cela suggère que les MPRs empruntent également une voie dépendante des endosomes de tri.

Une seconde structure a été particulièrement étudiée, d'abord chez la levure puis dans les cellules de mammifère, le rétromère (Bonifacino and Hurley, 2008) que je discuterai à la fin de ce manuscrit. Le rétromère est composé de deux complexes. Le premier complexe est formé de différentes combinaisons de protéines sorting-nexins (SNX) SNX1,2,5 et 6 portant un domaine BAR qui est un senseur de la courbure des membranes (Gallop and McMahon, 2005; Itoh and De Camilli, 2006) (**Fig.1.3.15**). Dans le cas de la SNX1, ce domaine BAR peut aussi induire des courbures membranaires conduisant à la formation de tubules au niveau des endosomes (Carlton et al., 2004). Les protéines SNX sont notamment impliquées dans le recrutement aux endosomes des protéines Vps (« Vacuola protein sorting »), Vps26, Vps29 et Vps35 (Rojas et al., 2007). Ce sous-complexe dit de « reconnaissance des cargos », et notamment la protéine Vps35, interagit avec des motifs portés par les domaines cytosoliques de différents cargos (Nothwehr et al., 2000; Seaman, 2007). Le rétromère coordonne ainsi le tri sélectif des cargos au niveau de tubules endosomaux qui ont pour devenir un trafic rétrograde vers le TGN. Ainsi, l'interférence avec les différents composants du rétromère altère le transport rétrograde. Par exemple, le transport rétrograde du CI-MPR depuis la membrane plasmique, la plupart du temps mesuré par le suivi d'un anticorps anti-CD8 internalisé avec la molécule chimérique CD8-MPR, est altéré en absence des composants du rétromère (Carlton et al., 2004; Freeman et

al., 2014; Griffin et al., 2005; Nothwehr et al., 2000; Popoff et al., 2009; 2007; Seaman, 2004; Wassmer et al., 2007). De même, le transport rétrograde de STxB nécessite le rétromère (Bujny et al., 2007; Popoff et al., 2007; Utskarpen et al., 2007). Par ailleurs, plusieurs liens fonctionnels entre la clathrine et le rétromère ont été démontrés. En effet, les sous-unités du rétromère et la clathrine sont localisées au niveau des mêmes endosomes (Popoff et al., 2007) et plusieurs molécules associées à la clathrine (Hrs, Hsc70) interagissent directement ou indirectement *via* la protéine RME-8 avec plusieurs sous-unités du rétromère (Vps35 et SNX1) (Popoff et al., 2009). L'inhibition de l'expression de RME-8 ou Hsc70 altère fortement le transport rétrograde de STxB mais aussi du CI-MPR.

Par ailleurs, le rétromère constitue également une plateforme de recrutement d'autres molécules dont les fonctions contribuent à l'émergence de vésicules rétrogrades depuis les endosomes. En effet, le complexe WASH (la sous-unité Fam21) interagit avec Vps35 (Harbour et al., 2010) et la SNX1 *via* RME-8 (Freeman et al., 2014) suggérant qu'une nucléation d'actine-F a lieu au niveau des tubules endosomaux. Il a ainsi été démontré par les groupes d'Alexis Gautreau et de Daniel D. Billadeau, que le complexe WASH est un régulateur général de la fission des vésicules d'origine endosomale et contribue à la nucléation d'actine-F médiée par Arp2/3 au niveau des endosomes (Derivery et al., 2009; Gomez and Billadeau, 2009; Jia et al., 2012). L'inhibition du complexe WASH dans les cellules 3T3 induit ainsi un défaut de fission au niveau des endosomes conduisant à leur tubulation exagérée (Derivery et al., 2009). Enfin, un criblage génétique par double-hybride confirmé par co-immunoprécipitation a déterminé des interactions directes entre les SNX5/6 et le complexe activateur de la dynéine (dynactine, p150glued) (Wassmer et al., 2009). L'inhibition de l'expression de p150glued inhibe le transport rétrograde des vésicules SNX6/Rab6a' et interfère avec le retour des cargos MPRs au TGN.

Enfin, bien que la discrimination entre les endosomes de tri et les endosomes de recyclage (Rab11⁺) soit encore floue, il a également été proposé que Rab11 soit impliquée dans le transport des cargos TGN38 et STxB (**Fig.1.3.14**). En effet, l'utilisation de formes dominantes négatives (S25N) ou constitutivement active (Q70L)

ou bien l'utilisation d'ARNi spécifique de Rab11a/b altèrent, bien que partiellement, le transport rétrograde de ces cargos (Jing et al., 2010; Wilcke et al., 2000).

Régulation de l'entrée dans l'appareil de Golgi

Le retour des cargos rétrogrades vers les voies de sécrétions golgiennes nécessite plusieurs partenaires moléculaires impliqués dans l'attachement ou la fusion des vésicules rétrograde avec le compartiment accepteur que constitue le TGN. Rab6 constitue un des acteurs jouant un rôle primordial dans cette étape du transport rétrograde. Je détaillerai donc ici les liens fonctionnels entre Rab6 et divers effecteurs de ce transport.

i. La reconnaissance et l'attachement des cargos rétrograde au TGN

Le laboratoire de Bruno Goud a pu déterminer que la petite GTPase Rab6a' et non Rab6a contribue de manière importante au transport rétrograde de différents cargos comme la STxB (Del Nery et al., 2006) ou l'intégrine $\beta 1$ (Shafaq-Zadah et al., 2015). Il est également proposé que les deux isoformes Rab6a et Raba' soient impliqués dans le transport de la ricine (Utskarpen et al., 2006). Ainsi, l'inhibition de l'expression de Rab6a' à l'aide d'ARNi diminue de 75% l'entrée de la toxine dans l'appareil de Golgi. Plusieurs fonctions pourraient être attribuées à cette petite GTPase dans les voies de transport rétrograde. L'équipe de Peter J. Cullen a ainsi pu déterminer que la sous-unité SNX1 du rétromère interagit directement avec Rab6IP1 (DENND5A) (Fernandes et al., 2012; Wassmer et al., 2009). Rab6IP1 interagit avec Rab6 induisant son recrutement à l'appareil de Golgi (Janoueix-Lerosey et al., 1995; Miserey-Lenkei et al., 2007; Recacha et al., 2009). L'inhibition de l'expression de Rab6IP1 altère considérablement le retour au Golgi de CI-MPR suggérant que Rab6 *via* Rab6IP1 est impliquée dans la reconnaissance des cargos rétrogrades (Wassmer et al., 2009). Par ailleurs, il est notable que Rab6IP1 serait capable de se lier à Rab11-GTP (Miserey-Lenkei et al., 2007). Des analyses de FRET/FLIM dans des cellules HeLa surexprimant Rab6IP1 ont montré que Rab11 et Rab6 peuvent interagir. Il peut donc être envisagé

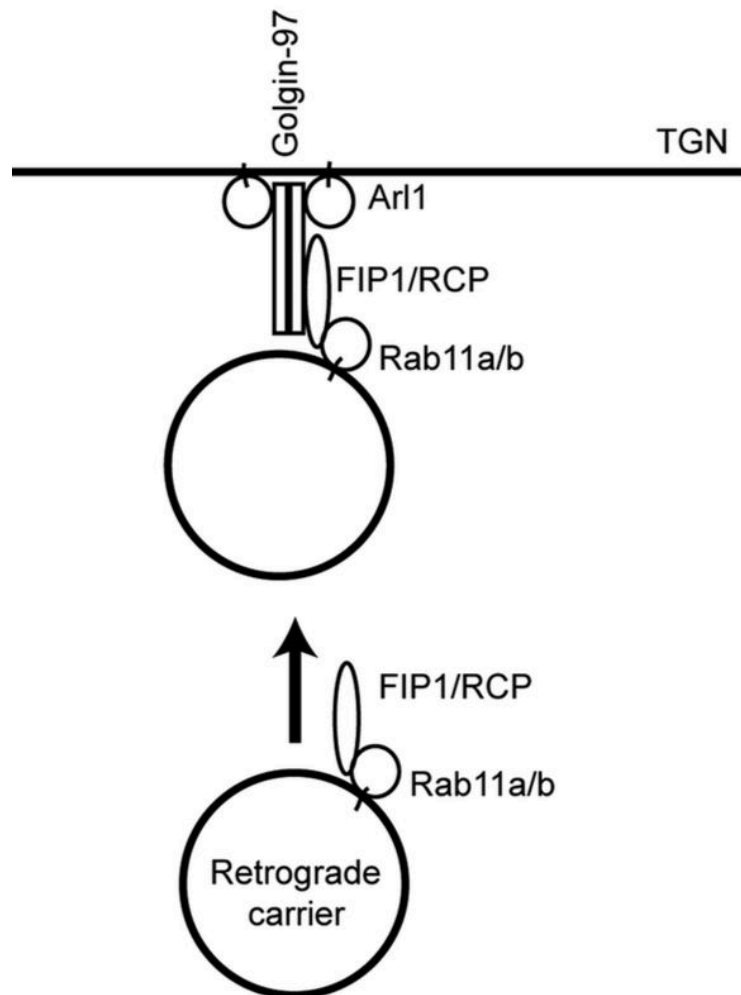


Figure 1.3.16. Exemple d'un modèle d'arrimage des vésicules rétrogrades au TGN médié par la golgine-97. Les cargos rétrogrades provenant des endosomes de recyclage s'arriment au TGN par l'interaction de Rab11-FIP1 (RCP) avec la golgine-97. Cette dernière est recrutée au TGN par les petites GTPases Arl1 et Rab6 (Jing et al., 2010).

que Rab6IP1 faciliterait l'interaction de vésicules rétrogrades Rab11⁺ pour une entrée dans le Golgi.

L'attachement des vésicules (en anglais, « tethering ») constitue une étape importante de l'entrée des vésicules au TGN et la famille des Golgines a beaucoup été étudiée dans ce processus. De nombreuses preuves suggèrent que Rab6 établirait ainsi une plateforme d'entrée des cargos rétrogrades par régulation de plusieurs golgines localisées à la face « trans » du Golgi. Notamment, il est aujourd'hui établi que la golgine-97 interagit avec Rab6-GTP (Barr, 1999; Gillingham et al., 2014; Sinka et al., 2008). Plusieurs groupes ont par ailleurs montré que la golgine-97 présente à la membrane du TGN est importante pour le trafic rétrograde des cargos TGN38 et StxB (Jing et al., 2010; Tai et al., 2005). Il est ainsi proposé que cette golgine interagit avec l'effecteur Rab11-FIP1 (Rab11 Family interacting protein-1, ou RCP, Rab-coupling protein) et permettant l'attachement des vésicules provenant des endosomes de recyclage au TGN (Jing et al., 2010) (**Fig.1.3.15**). En absence de la golgine-97, les cargos de TGN38 provenant de la membrane s'accumulent dans des compartiments endosomaux. Il est toutefois notable que l'absence de la golgine-97 n'a qu'un effet partiel sur le transport rétrograde de TGN38 suggérant que ce cargo emprunte d'autres voies rétrogrades ou bien que d'autres facteurs d'attachement sont nécessaires. En effet, des approches d'extinction d'expression dans les cellules HeLa ont permis de démontrer que la golgine GCC88, un autre effecteur de Rab6 (Gillingham et al., 2014; Sinka et al., 2008), est impliquée dans le transport de TGN38 et de CI-MPR mais pas de la STxB (Lieu et al., 2007). Par ailleurs, la golgine GCC185 est également impliquée dans l'entrée au TGN de plusieurs cargos rétrogrades. Bien que l'analyse de son rôle dans le trafic rétrograde soit compliquée par sa fonction dans l'intégrité de la structure de l'appareil de Golgi, plusieurs travaux ont pointé cet effecteur dans le transport rétrograde de la STxB mais pas de TGN38 (Derby et al., 2007; Hayes et al., 2009; Reddy et al., 2006). En accord avec des données montrant que GCC185 interagit avec la petite GTPase Rab9, il a également été établi que GCC185 est impliquée dans le retour de CI-MPR au TGN (Burguete et al., 2008; Derby et al., 2007; Hayes et al., 2009; Reddy et al., 2006). Le rôle de Rab6 dans la fonction de la golgine GCC185 a

été débattu. Si le groupe de Suzanne R. Pfeffer a proposé que le recrutement de GCC185 aux membranes de l'appareil de Golgi nécessite sa double interaction avec les petites GTPase Arl-1 et Rab6, plusieurs autres groupes comme ceux de Paul A. Gleeson et Bruno Goud n'ont pas réussi à confirmer cette interaction, ni par des approches génétiques (Y2H) ni par biochimie (chromatographie d'affinité) (Gillingham et al., 2014; Houghton et al., 2009; Sinka et al., 2008). Cela n'exclut cependant pas un rôle indirect de Rab6 dans la localisation de GCC185 au TGN. Enfin, le complexe GARP (« Golgi associated retrograde protein complex » ou VFT pour « Vps fifty-three ») a également été associé à l'attachement des vésicules rétrogrades aux membranes du TGN. GARP est composé de trois protéines Vps (Vps52, Vps53, Vps54) dont la sous-unité Vps52 interagit avec Rab6 dans les cellules de mammifères et avec la protéine orthologue de Rab6 (Ypt6) chez la levure (Liewen et al., 2005). Dans les cellules de mammifères, l'absence de GARP altère le transport rétrograde de TGN46, du CI-MPR et de la STxB qui s'accumulent dans des vésicules non attachées (Pérez-Victoria et al., 2008) suggérant le rôle de « tethering » de ce complexe.

ii. La fusion des cargos rétrogrades avec le TGN

L'analyse plus avant de la fonction de GARP par le laboratoire de Juan S. Bonifacino a permis de mettre en évidence une seconde fonction, indépendante de la première, et qui est l'induction d'un complexe de fusion membranaire au TGN comprenant les protéines t-SNARE syntaxine-6, syntaxine-16, Vti1a, et de la protéine v-SNARE VAMP-4 (Pérez-Victoria and Bonifacino, 2009). En effet, les sous-unités Vps53 et Vps54 interagissent directement avec la syntaxine-6, la syntaxine-16, VAMP-4. En absence de Vps54, des défauts de co-immunoprécipitations des différentes SNAREs entre elles ainsi que leur délocalisation sont observés. Cela suggère fortement que GARP est impliquée dans la nucléation de ce complexe SNARE et dans la fusion des vésicules rétrogrades avec le TGN (Pérez-Victoria et al., 2008; Pérez-Victoria and Bonifacino, 2009). Ces observations sont cohérentes avec les données obtenues par le groupe de Ludger Johannes montrant des défauts de transport au

TGN de la STxB et du cargo endogène TGN38 lors de l'interférence avec les fonctions des syntaxines-6/16, Vti1a et VAMP-4 (Mallard et al., 2002). Par ailleurs, la syntaxine-16 est également impliquée dans le retour du CI-MPR au TGN, ce qui souligne la fonction centrale de la syntaxine-16 dans la fusion des vésicules rétrograde au TGN (Amessou et al., 2007). Il est ainsi proposé que la v-SNARE VAMP4 qui est présente au niveau de compartiments rétrogrades soit nécessaire à la fusion membranaire avec les t-SNAREs syntaxine-6/16 et Vti1a présentes au TGN. Par ailleurs, le groupe de Ludger Johannes a montré que VAMP3, également présente dans des compartiments endosomaux, fait partie d'un complexe de fusion membranaire nécessaire au transport rétrograde. En effet, le clivage de VAMP3 en présence de la chaîne légère de la neurotoxine tétanique altère le transport rétrograde de la STxB dans les cellules HeLa (Mallard et al., 2002). Par ailleurs, d'intéressants travaux provenant du groupe de Suzanne R. Pfeffer ont permis de discriminer deux complexes de fusion membranaire différents selon l'origine endosomale des cargos rétrogrades (Ganley et al., 2008). Basé sur ce travail et d'autres, le modèle actuel propose que deux complexes coexistent. Le premier est caractérisé par la syntaxine-10 qui interagit également avec GARP (Liewen et al., 2005) et inclut également la syntaxine-16, Vti1a et VAMP3/VAMP4. Ce complexe est spécifique de la fusion des cargos provenant des endosomes tardifs (MPRs). Le second complexe dépend de la présence de la syntaxine-6 et inclut la syntaxine-16, Vti1a et VAMP3/VAMP4. Ce dernier complexe permettrait la fusion des cargos TGN46 ou contenant la toxine du choléra ou StxB. Enfin, il est intéressant de noter que Rab6 pourrait également réguler ces complexes SNAREs en régulant l'interaction de la golgine GCC185 avec la syntaxine-16 (Ganley et al., 2008) démontrant encore une fois le rôle clé joué par Rab6 dans la régulation de cette voie de trafic intracellulaire.

Autres cargos endogènes empruntant un transport rétrograde

Les molécules de TGN38/46 et les MPRs ont constitué des modèles de cargos qui ont permis de définir un grand nombre d'acteurs moléculaires impliqués dans les voies de recyclage rétrogrades entre les endosomes et le TGN. D'autres cargos

empruntent de telles voies de recyclage et permettent d'assurer des fonctions physiologiques données. L'altération des voies rétrogrades peut être à l'origine de pathologies (Burd, 2011).

Un exemple intéressant pour sa portée clinique, est celui de la protéine APP (« amyloid precursor protein ») qui est étroitement associée à la maladie d'Alzheimer. Cette protéine transmembranaire est localisée à la surface mais aussi dans les endosomes et l'appareil de Golgi des neurones. Il apparaît que la régulation du trafic intracellulaire de APP est important pour un clivage approprié de la protéine, certains produits de clivage étant associés aux plaques amyloïdes constatées chez les patients atteints d'Alzheimer (Small and Gandy, 2006). Chez les patients atteints d'Alzheimer, les sous-unités du rétromère Vps35 et Vps26 sont sous-exprimées dans les régions du cerveau atteintes (Small et al., 2005). Par ailleurs, l'utilisation, dans les neurones, d'ARNi spécifiques de Vps35 et Vps26 induit l'augmentation de la production d'A β , un produit de clivage de APP associé à la progression de la maladie (Muhammad et al., 2008; Nielsen et al., 2007; Small et al., 2005; Vieira et al., 2010).

Les laboratoires de Bruno Goud et de Ludger Johannes ont tenté de déterminer les cargos rétrogrades endogènes dans les cellules HeLa par une approche globale par protéomique (Shafaq-Zadah et al., 2015). Cette approche novatrice a consisté à sur-exprimer la protéine chimérique Galactosyl-Transférane résidente dans le Golgi et étiquetée avec la protéine SNAP-tag. Cette étiquette a la capacité de se lier de manière covalente avec la benzylguanine (BG). Ainsi, le marquage des protéines de surface avec une forme non perméable de BG, permet de suivre les cargos rétrogrades qui restent piégés par le SNAP-tag au niveau du Golgi. Il a ainsi été déterminé que la forme inactive de l'intégrine β 1 suit un transport rétrograde dépendant de la sous-unité du rétromère Vps35, de Rab6a', et des syntaxines-6/16 mais indépendant de Rab11. Outre l'importance de cette voie pour l'adhésion cellulaire, il est proposé que le transport rétrograde des cargos β 1⁺ soit impliqué dans le recyclage polarisé de ce cargo à l'avant des cellules migrantes. Ainsi, en absence de la machinerie de transport rétrograde (syntaxine-16 ou Rab6) un défaut de migration persistante des cellules est observé. Cela a été confirmé chez *Caenorhabditis elegans* dont la formation des

gonades nécessite la migration persistante d'une cellule de tête. En effet, chez des mutants de *rab-6.2*, ou *vps-35*, la migration anarchique de cette cellule résulte dans la malformation des gonades. Une autre étude récente a également montré chez *C. elegans* que *rab-6.1* et *rab-6.2* sont notamment impliquées dans le transport rétrograde de la sous-unité GLR-1 du récepteur au glutamate. L'inhibition de ce transport conduit à une altération du comportement des animaux mutants (D. Zhang et al., 2016).

Enfin, comme il l'a été souligné dans les parties précédentes, certaines entités pathogènes comme des toxines (choléra, Shiga, ricine) peuvent mettre à profit les voies de transport rétrograde afin d'atteindre leurs cibles moléculaires. Un criblage de banque de siRNAs a permis de mettre en évidence le rôle de Rab6 et GARP dans l'infectiosité du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Brass et al., 2008). En effet, l'absence de Rab6 ou de Vps53 induit une diminution importante du pourcentage d'infection du modèle utilisé de cellules HeLa.

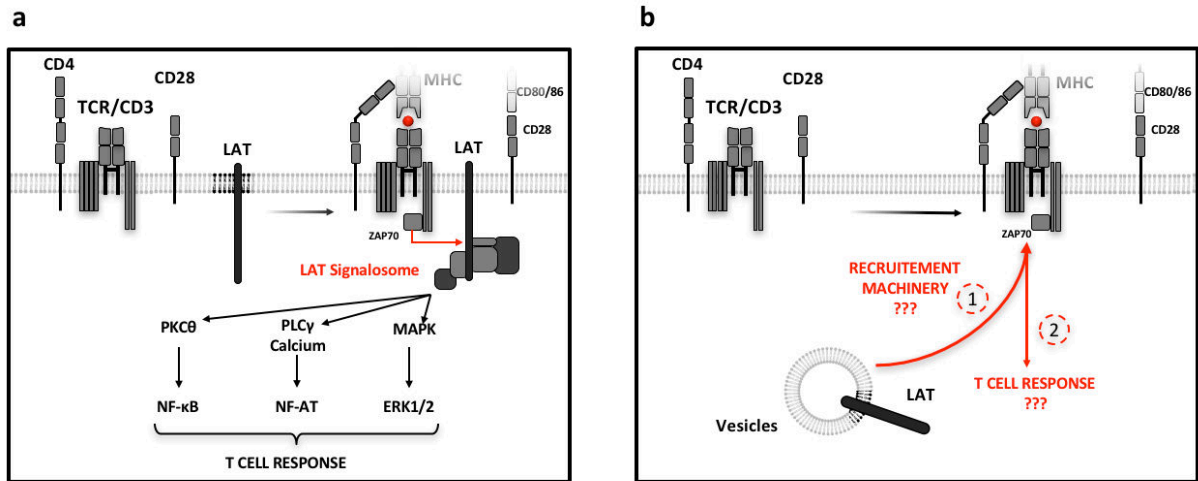


Figure 1.4.1. Objectifs de la thèse.

(a) Modèle linéaire de la signalisation lymphocytaire T qui s'opère uniquement à la membrane plasmique. Ce modèle des îlots membranaires initialement proposé par les équipes de M.M. Davis et L.E. Samelson (Lillemeier et al., 2010; Sherman et al., 2011) proposait qu'à l'état de repos des cellules T, le TCR et LAT sont localisés à la membrane plasmique dans des îlots membranaires séparés. Lors de l'engagement du TCR, ces îlots se mélangent permettant l'interaction entre LAT et sa kinase ZAP-70. Le signalosome LAT est ainsi formé à la membrane plasmique où il induit les différentes voies de signalisation nécessaires à la réponse lymphocytaire T. (b) Modèle de travail de notre équipe et d'autres (Bonello et al., 2004; Martín-Cófreces et al., 2012; Purbhoo et al., 2010; Soares et al., 2013a; Williamson et al., 2011) : LAT est présente dans des compartiments intracellulaires qui sont recrutés à la synapse immunologique. L'objectif de ma thèse était de comprendre la machinerie de transport impliquée dans ce recrutement, ainsi que son importance dans la signalisation et la réponse lymphocytaire T. Nous nous sommes intéressés, entre autres, à la protéine v-SNARE VAMP7, à la petite GTPase Rab6 et à la protéine de transport intraflagellaire IFT20.

1.4. Objectifs de la thèse : analyse du trafic intracellulaire de LAT et de son rôle dans l'activation lymphocytaire T.

L'identification du « Linker for Activation of T cells », LAT, dans les années 1990, ainsi que, par la suite, la mise en évidence de son rôle activateur, mais aussi régulateur de la signalisation lymphocytaire T, a très largement contribué à une meilleure compréhension de la biologie du lymphocyte T. LAT était cependant à l'époque considérée comme un marqueur de la membrane plasmique, et l'idée que la signalisation médiée par $p56^{Lck}$, le TCR et LAT s'opèrent exclusivement à la membrane plasmique en quelques minutes était admis pour beaucoup (Balagopalan et al., 2013; Lillemeier et al., 2010; Sherman et al., 2011) (**Fig.1.4.1a**). Cependant, l'établissement d'une synapse immunologique, et surtout le remaniement du cytosquelette de microtubules, le recrutement du MTOC et le temps de persistance d'une synapse, suggère que des événements ultérieurs, non moins importants, sont nécessaires à une réponse lymphocytaire T soutenue et robuste. Notamment, l'observation du recrutement de la fraction intracellulaire de LAT à la synapse immunologique, un travail initié entre autre par notre équipe (Bonello et al., 2004), a permis de poser l'hypothèse que cette fraction pouvait contribuer à la signalisation et à l'activation T, comme cela avait été suggéré pour le TCR ou $p56^{Lck}$ (Das et al., 2004; Ehrlich et al., 2002). Cependant, ces observations réalisées par vidéomicroscopie, bien que très intéressantes, n'étaient que descriptives et ne constituaient pas une preuve finale de la contribution du transport intracellulaire de LAT dans la signalisation lymphocytaire T.

Le besoin d'étudier les voies de transport intracellulaire, et plus précisément les acteurs moléculaires impliqués dans le transport de LAT à la synapse immunologique, est apparu évident et nécessaire pour comprendre l'importance de ce transport dans la réponse lymphocytaire T. L'enjeu principal de ma thèse a été de comprendre et de caractériser la ou les voies de transport intracellulaire empruntée(s) par LAT, ainsi que d'évaluer l'importance de ce transport sur la réponse lymphocytaire T *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* (**Fig.1.4.1b**).

Le trafic intracellulaire de cargos met en jeu divers acteurs nécessaires au bourgeonnement des vésicules d'un compartiment donneur, au transport médié par le cytosquelette, et à l'arrimage/fusion des vésicules avec le compartiment accepteur. Au cours de ma thèse, nous nous sommes ainsi principalement intéressés à trois familles de protéines impliquées dans le trafic intracellulaire :

- i* . La protéine v-SNARE VAMP7
- ii* . La petite GTPase Rab6
- iii* . La protéine de transport intraflagellaire IFT20

Ce travail de thèse a ainsi consisté à évaluer le rôle de ces acteurs moléculaires dans le transport intracellulaire de LAT ainsi que dans la signalisation et la réponse lymphocytaire T. Pour cela, nous avons utilisé divers modèles de lymphocytes T humains et de souris invalidées pour ces protéines, ainsi que différentes approches expérimentales (microscopie, biochimie, analyses fonctionnelles *in vitro* ou *in vivo*).

PARTIE 2 - MATÉRIEL & MÉTHODES

2.1. Cellules & Souris

Les cellules T Jurkat (clone E6.1) et les cellules B Raji ont été cultivées à 37°C, 5% CO₂, en RPMI 1640 Glutamax (Gibco, 61870-010) supplémenté avec du sérum de veau foetal (10%) (SVF, Lonza, DE14-801F) et ont été passées tous les 2 à 3 jours à environ 0,5x10⁶ cellules/mL.

Les lignées de souris Rab6 (Bardin et al., 2015) et VAMP7 (Danglot et al., 2012) ont été rétrocroisées sur plus de 10 générations sur le fond génétique C57BL/6J. Pour la lignée Rab6, la détection des sites *LoxP* flanquant l'exon 4 de Rab6a/a' a été réalisée par PCR en utilisant les amorces sens 5'-TTGCCTCCCTGTTTGTACCAGTACGCT-3' et anti-sens 5'-CTTCAACACAAGCCATGAAGGATCTGG-3'. Afin d'obtenir l'excision de l'exon 4 du gène *RAB6* dans les lymphocytes T, les souris Rab6^{flox/flox} ont été croisées avec les souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre sous le promoteur du gène CD4. Les souris Rab6^{flox/flox} CD4-Cre⁺ (Rab6 cKO mice) et les contrôles de portée Rab6^{wt/wt} CD4-Cre⁺ entre 8 et 12 semaines ont été utilisées pour les expériences. Pour la lignée Rab6 cKO, femelles et males ont été utilisés et les souris cKO et contrôles de même sexe ont été appariées dans chaque expérience. Pour la lignée VAMP7 KO, seules les souris mâles VAMP7^{Y/+} et VAMP7^{Y/-} ont été utilisées. Pour les souris IFT20 cKO, se référer à (Vivar et al., 2015) dans la section Résultats. Les organes (rate, thymus, ganglions lymphatiques, moelle osseuse) ont été dissociés et filtrés afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés par immunodéplétion négative à partir des rates et des ganglions lymphatiques à l'aide d'un kit Miltenyi (130-104-454) et la pureté de lymphocyte T CD4⁺ atteignait en moyenne 95%. Les cellules de souris ont été cultivées en RPMI 1640 Glutamax supplémenté avec 10% SVF, 1% pénicilline/streptomycine (Gibco, 15-140-122), 10mM HEPES (Gibco, 15630-080), 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco, 11140-050), 1mM pyruvate de sodium (Gibco, 11360-070), 0,05mM β-mercaptoethanol (Gibco, 31350-010) à 37°C, 5% CO₂.

Les souris BALB/cByJ et OT-II ont été obtenues chez Charles River et les souris Rag2 KO et CD4-Cre ont été élevées dans notre animalerie. L'irradiation des cellules et des souris a été réalisée par un générateur à rayon X (Philips 320kV) pendant des temps d'exposition calculés selon la dosimétrie faite périodiquement afin d'irradier avec des doses définies.

Pour l'obtention des cellules primaires humaines (lymphocytes T CD4⁺ et cellules dendritiques) à partir de sang humain, se référer à (Larghi et al., 2013) dans la section Résultats.

2.2. Anticorps et réactifs

Pour l'activation des cellules Jurkat, les anticorps monoclonaux anti-humains anti-CD3 ϵ (clone OKT3, 125ng/mL, eBioscience, 16-0037-85) et anti-CD28 (clone CD28.2, 250ng/mL, Biolegend, 302923), et la forme recombinante de l'enterotoxine staphylococcique de type E (SEE, Cellgenetech, MBS1112600) ont été utilisés. Pour les superantigènes TSST1 et SEB utilisés pour l'activation des lymphocytes T CD4⁺ humains, se référer à (Larghi et al., 2013) en section Résultats. Pour l'activation des lymphocytes T de souris, les anticorps monoclonaux anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11, BD, 553057), anti-CD28 (clone 37.51, BD, 553294), le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma, 79346) et la ionomycine (Calbiochem, 407950) ou les peptides de classe-I OVA257-264 ou de classe-II ont été utilisés aux concentrations indiquées.

2.3. Production de lentivirus et infection des cellules Jurkat

Les particules non réplicatives pseudotypées VSV-g ont été produites par transfection dans les cellules HEK-293T avec le plasmide pPAX2 codant pour les protéines Gag, Pol, env, le plasmide pMD2.G codant pour l'enveloppe et le plasmide pLKO.1 codant pour les séquences des « short-hairpins » ARNs (shRNA). Un shRNA contrôle ne ciblant aucun ARN de mammifère connu (shC, Sigma-Aldrich, Mission shRNA SHC002), les shRNAs ciblant les ARNm transcrits du gène VAMP7, sh1 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000059888) et sh5 (Sigma-Aldrich, Mission

shRNA, TRCN0000059892), les shRNAs ciblant les ARNm transcrits du gène Rab11a, sh1 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000381243), sh2 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000381214), sh3 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000379577), sh4 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000303291), sh5 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000073022), les shRNAs spécifiques de Rab6a/a', sh6 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000379588) et sh7 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000379794) et spécifiques de la syntaxine-16 shRNA, sh1 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000229991) et sh5 (Sigma-Aldrich, Mission shRNA, TRCN0000161930) ont été introduits dans le vecteur pLKO.1. Les lentivirus ont été récupérés dans le surnageant de culture après 2 jours et concentrés. 5×10^6 de cellules T Jurkat ont été infectées pendant 24h, sélectionnées en puromycine ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$, Invivogen, ant-pr-1) et utilisées à jour 5 post-infection. Pour l'infection des cellules T CD4⁺ primaires humaines, se référer à (Larghi et al., 2013) en section Résultats.

2.4. Plasmides et transfection

Les plasmides codant pour les molécules chimériques GFP-VAMP7 (20 μg), HA-LAT (30 μg), mCherry-LAT (10 μg), GFP-Rab6a' (10 μg), ont été électroporés dans les cellules T Jurkat. Pour cela, $10 \times 10^6/500 \mu\text{L}$ de cellules ont été lavées et resuspendues en RPMI sans SVF pour être électroporées dans des cuvettes d'électroporation (4mm gap, Molecular BioProducts, 5540-11) avec l'électroporateur Gene Pulser (Biorad, 960 μF , 0,26V). Les cellules ont été récupérées et diluées en RPMI préchauffé supplémenté avec 10% SVF et cultivées pendant 24h à 37°C, 5% CO₂.

2.5. Activation des cellules T Jurkat pour analyses phospho-blot

Les cellules T Jurkat et les cellules B Raji ont été lavées et resuspendues respectivement à 1×10^6 cellules/mL and 0.5×10^6 cellules/mL. 1mL de cellules Jurkat et 0,5mL de cellules Raji ont été mixées dans des tubes ependorfs de 2mL et équilibrées

pendant 15-30 minutes au bain-marie (37°C). 100ng/mL de SEE ont été ajoutés à différents temps en suivant une cinétique inversée. En fin d'incubation, les cellules ont été déposées sur glace afin d'arrêter l'activation. Elles ont ensuite été centrifugées à 1800g, 4 minutes à 4°C et incubées en tampon de lyse pendant 20 minutes dans 30µL de tampon de lyse froid (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 1% Glycérol, 1% TritonX100, 0,5mM EDTA pH8, 5mM NaF) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, 11873580001) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (Thermo Scientific, 78420). Les lysats post-nucléaires ont été obtenus par centrifugation à vitesse maximale pendant 15 minutes à 4°C et ont été gardés à -20°C jusqu'à l'analyse par immunoblot. Pour les activations de lymphocytes T CD4⁺ de souris, se référer à (Larghi et al., 2013) en section Résultats.

2.6. Analyse par immunoblot

Les concentrations en protéines provenant des échantillons de souris ont été déterminées à l'aide d'un kit microBCA (Thermo Scientific, 23235) en diluant les échantillons au 1/50. Le tampon de charge NuPage LDS (Thermo Fisher Scientific, NP0008) et l'agent réducteur (Thermo Fisher Scientific, NP0009) ont été ajoutés aux lysats post-nucléaires qui ont ensuite été chauffés 5 minutes à 95°C. 10µg de protéines ont été chargés sur des gels NuPage 4-12% Bis-Tris gel (Thermo Fisher Scientific, NP0323BOX) et transférés par transfert liquide (Thermo Fisher Scientific, NP00061) sur des membranes PVDF (Biorad, 162-0177). Après blocage des sites aspécifiques des protéines transférées en TBS 0.05% Tween20 5% BSA pendant 30 minutes sous agitation douce, les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-Rab6 (0,2µg/mL, Santa Cruz Biotechnology, sc-310), anti- α -Tubulin (1/1000, Calbiochem, CP08), anti-phospho-LAT Y191 (1/1000, Millipore, 07-278), anti-phospho-CD3 ζ Y142 (1/1000, BD, 558402), anti-syntaxin-16 (0,1µg/mL, Abcam, ab134945) ou anti-gp96 (1/1000, Enzo, ADI-SPA-850).

Les membranes ont été lavées trois fois en TBS 0.05% Tween et incubées pendant 40 minutes en TBS 0.05% Tween sous agitation douce avec les anticorps secondaires appropriés couplés à l'enzyme HRP (1/20,000, Jackson

ImmunoResearch) : anti-Lapin HRP (111-036-046), anti-Souris HRP (115-035-146) ou anti-Rat HRP (112-035-143). Les membranes ont été lavées 3 fois et incubées pendant une minute avec le substrat de l'enzyme HRP (Enhanced Chemiluminescence, Thermo Scientific, 32106). Les films d'autoradiographie (Amersham, 28906844) ont été exposés aux membranes pendant différents temps d'exposition et révélés avec le processeur de film AGFA CP100.

2.7. Traitement des cellules T Jurkat par la monensine

Les cellules T Jurkat ont été pré-traitées pendant 15 minutes avec 1,25µg/mL de monensine (Sigma-Aldrich, M5273, resuspendue en éthanol) ou avec de l'éthanol. Les cellules ont ensuite été conjuguées avec les cellules B Raji en présence de 1,25µg/mL de monensine ou d'éthanol pendant 30 minutes avant d'être fixées, marquées et analysées par microscopie.

2.8. Microscopie électronique à transmission

La microscopie immuno-électronique a été réalisée en utilisant la méthode Tokuyasu (Slot and Geuze, 2007). 7×10^6 cellules T Jurkat exprimant la construction HA-LAT ont été fixées en 0,1M PB 4% paraformaldéhyde pendant 2 heures à température ambiante. Des cryosections ultrafines ont été double-marquées avec un anticorps polyclonal anti-Rab6 (préparé par Sabine Bardin, équipe de Bruno Goud, 1/40), un anticorps anti-LAT (Millipore, 06-807) et des particules d'or couplées à la protéine A (PAG; Utrecht University, Pays-Bas, 6nm pour LAT and 10nm pour Rab6). Les sections ont été observées avec un microscope TecnaiG2 Spirit BioTWIN (FEI, Eindhoven, Pays-Bas) équipé avec une caméra 4k CCD (EMSIS GmbH, Münster, Allemagne).

2.9. Immunofluorescence

2.9.1. Préparation des lamelles et boîtes fluorodish

Des lamelles de 12mm de diamètre (VWR, 631-0666) pour les cellules fixées et des boîtes fluorodishes (World Precision Instrument Inc, FD35-100) pour l'imagerie

de cellules vivantes ont été pré-recouvertes avec de la poly-L-Lysine (0,02%, Sigma-Aldrich, P8920) pendant 20 minutes à température ambiante et ont ensuite été lavées 3 fois à l'eau, séchées et gardées pendant 2 jours au maximum.

2.9.2. Formation de conjugués entre les cellules Jurkat et B Raji

Les cellules B Raji ont été lavées et resuspendues à la concentration de 1×10^6 cellules/mL en RPMI sans SVF pour être marquées avec le colorant CellTracker™ Blue CMAC (10 μ M, Thermo Fisher, C2110) pendant 20 minutes. La réaction a été stoppée avec du RPMI 10% SVF et les cellules ont été lavées et resuspendues à 1×10^6 cellules/mL. Les cellules ont été pulsées avec le SEE (100ng/mL) ou ont été laissées sans traitement pendant 30 minutes au bain-marie (37°C) avant d'être lavées une fois et resuspendues à la concentration de 0.5×10^6 cellules/mL. 75 000 cellules B Raji ont été incubées sur des lamelles pendant 30 minutes avant d'être lavées avec du PBS pré-chauffé. 100 000 cellules T Jurkat resuspendues en RPMI 10% SVF ont été ajoutées aux cellules Raji pendant 30 minutes. Les lamelles ont ensuite été lavées en PBS froid avant fixation.

2.9.3. Capture d'anticorps anti-HA

Les cellules T Jurkat transfectées avec la construction HA-LAT ont été lavées et déposées sur des lamelles pendant 30 minutes à 37°C en RPMI 10% SVF. La moitié des lamelles ont été incubées pendant 20 minutes supplémentaires à 37°C et le reste a été disposé à 4°C afin de bloquer le transport intracellulaire. Les cellules ont été lavées respectivement avec du PBS préchauffé et du PBS froid, avant l'ajout de l'anticorps souris anti-HA dilué en RPMI 10% SVF (1/200, BioLegend, 901515). Après 4 heures d'incubation à 37°C ou à 4°C, les lamelles ont été lavées en PBS froid et fixées pour ensuite être marquées et analysées par microscopie.

2.9.4. Microscopie TIRF sur cellules fixées et vivantes

Pour l'imagerie de cellules fixées, les lamelles recouvertes de poly-L-Lysine ont été laissées sans traitement ou bien recouvertes avec les anticorps activateurs anti-

CD3 ϵ /anti-CD28 (anti-souris ou anti-humains), à 4°C toute la nuit ou à 37°C pendant 3 à 4 heures. Les lamelles ont été lavées 3 fois et pré-chauffées à 37°C pendant 10 à 15 minutes. 150 000 cellules T humaines (Jurkat ou lymphocytes T CD4⁺ humains) ou cellules T CD4⁺ de souris ont été incubées sur les lamelles pendant 10 minutes avant d'être lavées en PBS froid, puis fixées. Pour l'imagerie de cellules vivantes, les boîtes fluorodish ont été recouvertes d'anticorps activateurs en suivant le même protocole. 500 000 cellules Jurkat transfectées avec des plasmides exprimant des constructions fluorescentes ont été déposées. Les images pour les canaux 491 et 561 ont été acquises toutes les 700ms.

2.9.5. Fixation des cellules

Les cellules ont été fixées en paraformaldéhyde 4% (Electron Microscopy Sciences, 15710) pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être lavées une fois en PBS. L'excès de paraformaldéhyde a été enlevé en PBS 10mM Glycine (Thermo Fisher Scientific, G8898) pendant 10 minutes. Les lamelles ont été gardées à 4°C en PBS jusqu'à la perméabilisation et le marquage.

2.9.6. Immunomarquages

Pour les marquages classiques, les cellules ont été perméabilisées pendant 30 minutes à température ambiante avec du PBS complété avec 0,2% Bovine Serum Albumin (BSA, Euromedex, 04-100-812) et 0,05% Saponine (Sigma-Aldrich, S4521). Les cellules ont ensuite été incubées pendant une heure à température ambiante avec les anticorps primaires suivants : Lapin anti-LAT (5 μ g/mL, Millipore, 06-807), Souris anti-LAT (5 μ g/mL, R&D, MAB63341), Lapin anti-GFP (1/200, Thermo Fisher Scientific, A11122), Souris anti-GFP (1/200, Thermo Fisher Scientific, A11120), Lapin anti-phospho-ZAP70 (1/50, Cell Signaling Technology, 2717), Lapin anti-Rab6 (1/400, Cell Signaling Technology, 9625), Lapin anti-Rab11 (1/100, Cell Signaling Technology, 5589) Lapin anti-syntaxine-16 (5 μ g/mL, Abcam, ab134945), Lapin anti-ZAP70 (1/400, Cell Signaling Technology, 3165). Les cellules ont été lavées 3 fois en PBS 0,2% BSA

0,05% Saponine et incubées à l'abri de la lumière pendant 20 minutes dans le même tampon avec les anticorps secondaires (1/300) appropriés aux anticorps primaires utilisés et préalablement centrifugés : anti-Lapin Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, A11036), anti-LapinAlexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A11034), anti-Souris Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, A11004), anti-Souris Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A11029). Après avoir été lavées une fois en PBS 0,2% BSA 0,05% Saponine, et une fois en PBS, les lamelles ont été trempées 3 fois en PBS, 3 fois à l'eau et ont été montées sur lames.

Pour le marquage de la forme endogène de LAT, les cellules ont été perméabilisées avec 0,1% TritonX100 pendant 4 minutes à température ambiante et lavées en PBS. Les sites aspécifiques ont été bloqués en « cold water fish gelatin » (0,25% en PBS, Aurion, 900.033) pendant 30 minutes et les cellules ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires (dont l'anticorps polyclonal purifié TG50 (anti-VAMP7) donné par le laboratoire de T.Galli) dilués en PBS 0,125% « cold water fish gelatin ». Les cellules ont été lavées en PBS 0,125% « cold water fish gelatin » et incubées avec les anticorps secondaires appropriés pendant 45 minutes à température ambiante.

2.9.7. Montages des lamelles sur lames

Pour la microscopie classique, les lamelles ont été montées sur lames (KNITTEL Starfrost) avec 4-6µL de Fluoromount G (SouthernBiotech, 0100-01) et séchées toute la nuit à l'abri de la lumière, avant l'acquisition des images. Pour la microscopie TIRF, après marquage avec les anticorps secondaires, les lamelles ont été trempées en PBS, montées sur lames avec 4-6µL de PBS, lutées avec du vernis à ongles non coloré et séchées pendant 15 minutes avant l'acquisition au microscope TIRF.

2.10. Microscopie et analyse d'images

2.10.1. Microscopes

Les images confocales ont été acquises avec le microscope LSM780 (Laser Scanning Microscope 780, Zeiss) de la plateforme PICT-IBiSA @Pasteur à l'Institut Curie. Il était équipé avec les objectifs Plan Apo 40X or 100X (ouverture numérique, 1,35) et un pinhole d'une taille de 1-airy unit. Des acquisitions en Z ou des plans de cellules ont été effectuées. La microscopie TIRF a été réalisée avec un microscope inversé Nikon Ti-E au centre d'imagerie Nikon de l'Institut Curie-CNRS. Le microscope TIRF était équipé avec un objectif 100X CFI Apo TIRF (ouverture numérique de 1,49), de lasers 491nm and 561nm et d'une caméra EMCCD 512 Evolve (Photometrics). La température était maintenue à 37°C. Les images ont été analysées avec l'application Fiji (Schindelin et al., 2012) compatible avec les scripts générés pour les analyses d'images automatiques ou semi-automatiques.

2.10.2. Analyse du recrutement de LAT à la synapse immune formée entre des cellules T Jurkat et des cellules Raji, et création de « cellules moyennes »

Un plan moyen a été choisi à partir de conjugués acquis en Z. Les images des cellules T ont été extraites et orientées dans la même direction selon la position de la synapse (script#1, voir Annexe 2). Pour chaque groupe expérimental (shRNA +/-RNA), la taille de chaque image a été normalisée par la taille de la plus petite image, afin de créer une pile de cellules alignées. Les intensités de fluorescence (MFI) ont ensuite été normalisées par la MFI de toutes les images pour chaque pile d'images (script#2, voir Annexe 2). Chaque pile d'images a ensuite été normalisée par la MFI, la hauteur moyenne et la largeur moyenne de toutes les piles d'images, afin d'obtenir des conditions de taille identique et présentant des MFI de cellules totales comparables. Les piles de cellules alignées ont enfin été projetées (méthode de moyennage), afin de produire une seule image moyenne (script#3, voir Annexe 2). Pour obtenir des profils moyens d'intensité de fluorescence sur la longueur de la cellule, les piles d'images provenant du script#2 ont été normalisées par la longueur moyenne, ainsi

que la MFI de tous les groupes expérimentaux. La hauteur de chaque pile a été réduite à 1 pixel, par moyennage de l'intensité de fluorescence sur la hauteur totale de chaque image. Les images créées ont été projetées par calcul de la moyenne ou de la déviation standard, et l'intensité de chaque pixel a été mesurée sur la longueur des images (script#4, voir Annexe 2). Afin d'obtenir une quantification de cellules individuelles, les MFI des cellules totales et les MFI de rectangles créés à la synapse immunologique et représentant 10,5% de la longueur totale des cellules ont été mesurées plan par plan, pour chaque pile de cellules alignées créées par le script#2. Pour chaque cellule, le ratio des deux MFI mesurées pour chaque cellule a été calculés et correspond à l'enrichissement de LAT à la synapse immunologique, exprimé en unité arbitraire (a.u.) (script#5, voir Annexe 2).

2.10.3. Analyse de LAT, phospho-LAT et ZAP70 à la synapse immunologique par microscopie TIRF

Pour chaque image acquise, le bruit de fond a été soustrait (« rolling ball radius » de 50 pixels). Les cellules ont été segmentées manuellement et les régions d'intérêt (ROIs) définies afin de mesurer l'aire des cellules. Au sein de chaque ROI, les microclusters de signalisation ont été déterminés par les maxima d'intensité de fluorescence détectés par la fonction « Find Maxima... », pour laquelle une valeur de tolérance du bruit a été arbitrairement entrée selon le bruit de fond présent d'une expérience à l'autre (valeur autour de 5000 dans la plupart des expériences). Les maxima ont été comptés pour chaque ROI donnant une quantification cellule par cellule du nombre de microclusters ou de la densité de microclusters (script#6, voir Annexe 2).

2.10.4. Analyse des aires des marquages de LAT et de l'appareil de Golgi sur des images confocales

Un plan moyen de chaque pile d'images provenant de l'acquisition en Z de conjugués Jurkat/Raji de taille similaire a été choisi. Les masques pour les cellules B Raji marquées avec le colorant CellTracker™ Blue CMAC ont été obtenus par

seuillage automatique (méthode « Otsu »). Les masques des conjugués T-B ont été créés par seuillage automatique (méthode « Default ») du marquage LAT. Les masques des cellules T ont par la suite été obtenus par soustraction des masques T-B par les masques B respectifs pour être définis comme régions d'intérêt (ROIs) à l'aide de la fonction « Analyze particles ... ». Au sein de chaque ROI, un masque de l'appareil de Golgi a été créé par seuillage automatique du marquage Rab6 (méthode « Shanbhag »). Les aires des marquages associés à LAT et à l'appareil de Golgi, ainsi que l'aire de chevauchement des deux marquages, ont été mesurées et les résultats ont été exprimés en pourcentage de la surface LAT chevauchant la surface Rab6 (script#7, voir Annexe 2).

2.11. Mesures de la sécrétion et production d'interleukine-2 dans les cellules T Jurkat.

Les cellules T Jurkat et les cellules B Raji ont été lavées et resuspendues à 1×10^6 cellules/mL. 100 μ L de cellules T Jurkat et 50 μ L de cellules B Raji ont été mélangées dans une plaque 96 puits à fond plat (TPP, 92096). 50 μ L de superantigène SEE aux concentrations finales indiquées ont été ajoutés, et les cellules ont été incubées pendant 6h. Les surnageants ont été récupérés et l'IL-2 a été mesurée par ELISA (BD OptEIA, 555190). Les ARNm totaux ont été isolés à partir des cellules avec le kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel, 740-955). La quantité d'ARNm transcrits à partir du gène codant pour l'IL-2 ont été mesurés par PCR quantitative (méthode Taqman) à l'aide d'amorces spécifiques des transcrits IL-2 (Thermo Fisher Scientific, Hs00174114_m1). Pour l'analyse de la production d'IL-2 par cytométrie en flux, les cellules ont été traitées avec 25 μ L de BFA (Sigma-Aldrich, B6542, concentration finale de 5 μ g/mL) 1h après le début de l'incubation des cellules en présence de SEE, et les cellules ont été incubées pendant 5h supplémentaires avant leur marquage.

2.12. Réaction Lymphocytaire Mixte (MLR)

Les rates de souris BALB/c ont été dissociées et filtrées. La suspension cellulaire homogène ainsi obtenue a été irradiée (20Gy) et utilisée comme source de cellules stimulatrices. Dans le cas des cultures séparées de cellules Rab6 WT et cKO, les cellules stimulatrices et les cellules répondeuses ont été respectivement marquées avec le colorant de prolifération cellulaire CFSE (2 μ M, Thermo Fisher Scientific, C34554) et CTV (2 μ M, Thermo Fisher Scientific, C34557). 4x10⁵ cellules répondeuses ont été co-cultivées avec les nombres indiqués de cellules stimulatrices. Dans le cas de la co-culture de lymphocytes T CD4⁺ Rab6 cKO et des lymphocytes T contrôles, les cellules ont été respectivement marquées avec les marqueurs CTV et CFSE, et mélangées avec les nombres indiqués de cellules stimulatrices. Comme contrôle positif, la prolifération des cellules a été induite avec de l'acétate phorbol myristate (PMA, 7.5x10⁻⁷ M) et de l'ionomycine (2x10⁻⁸ M). Les cellules ont été co-cultivées pendant 5 jours à 37°C, 5% CO₂, en milieu complet avant d'être marquées pour l'analyse par cytométrie de flux.

2.13. Génération de chimères hématopoïétiques et immunisations

2.13.1. Reconstitutions

Les souris Rag2KO ont été irradiées (5,5Gy) et reconstituées avec les cellules de moelle osseuse préalablement filtrées de souris Rab6 WT ou cKO. Après 8 à 10 semaines de reconstitution, les chimères hématopoïétiques ainsi générées ont été saignées, et la reconstitution des compartiments immunitaires a été vérifiée par cytométrie de flux. Pour les reconstitutions des chimères IFT20 cKO, se référer à (Vivar et al., 2015) en section Résultats.

2.13.2. Immunisations et restimulation des cellules

Les chimères hématopoïétiques ont été injectées en sous-cutané (flanc droit) avec 100 μ g de la protéine ovalbumine (OVA) (Sigma-Aldrich, A5503) ou 100 μ g d'OVA

émulsifiée avec l'Adjuvant Complet de Freund (CFA, Fisher Scientific, 11719062). Après 11 jours d'immunisation, les souris ont été sacrifiées, et les rates et les ganglions lymphatiques drainant ont été récupérés et dissociés. Les globules rouges ont été lysés (Sigma-Aldrich, R7757), puis la suspension a été filtrée avant comptage des cellules avec le cytomètre en flux MACS Quant. 1×10^6 , 0.5×10^6 ou 0.2×10^6 cellules par puits ont été déposées dans des plaques ELISPOT (Millipore, MAIPS4510), non activées et pré-recouvertes toute la nuit à 4°C avec les anticorps de capture anti-IFN γ (2 μ g/mL, clone AN-18, eBioscience, 14-7313), anti-IL-17A (eBioscience, 88-7370-88), anti-IL-2 (5 μ g/mL, clone JES6-1A12, eBioscience, 14-7022), anti-IL-4 (2 μ g/mL, clone 11B11, eBioscience, 14-7041) ou anti-IL-5 (2 μ g/mL, clone TRFK5, eBioscience, 14-7052) dilués dans le tampon ELISPOT approprié (eBioscience, 16-000-27), puis lavées 3 fois en milieu complet. Les cellules ont été restimulées avec l'antigène irrelevant HSA (Human Serum Albumin, 50 μ g/mL, Sigma-Aldrich, SRP6182), la protéine OVA utilisées pour les immunisations (50 μ g/mL), le peptide CMH de classe-I (OVA₂₅₇₋₂₆₄, 10 μ g/mL, Invivogen, vac-sin) ou de classe-II (OVA₃₂₃₋₃₃₉, 10 μ g/mL, Invivogen, vac-isq), ou enfin avec de la PMA (7.5×10^{-7} M) et ionomycine (2×10^{-8} M). Les réponses IFN- γ , IL-17A et IL-2 ont été mesurées 24h après restimulation, alors que les réponses IL-4 et IL-5 ont été mesurées après 48h de restimulation. Les plaques ELISPOT ont été lavées 3 fois en PBS 0,05% Tween et incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps de détection biotinylés anti-IFN γ (2 μ g/mL, clone R4-6A2, eBioscience, 13-7312), anti-IL-17A (eBioscience, 88-7370-88), anti-IL-2 (5 μ g/mL, clone JES6-5H4, eBioscience, 13-7021), anti-IL-4 (1 μ g/mL, clone BVD6-24G2, eBioscience, 13-7042), anti-IL-5 (1 μ g/mL, clone TRFK4, eBioscience, 13-7051) en tampon ELISPOT de dilution (eBioscience, 00-4202-55). Les plaques ont été lavées 4 fois en PBS 0,05% Tween et incubées avec l'alkaline phosphatase conjuguée à la streptavidine (1/1000, MABtech, 3310-10) en tampon ELISPOT de dilution. Après 45 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques ont été lavées 3 fois en PBS 0,05%, puis 2 fois en PBS avant l'ajout du substrat de l'alkaline phosphatase (Biorad, 170-6432). La réaction a été stoppée avec de l'eau et les plaques ont été séchées avant le comptage des « spots » avec le lecteur de plaque AID EliSpot reader.

2.13.3. Modèle de colite induits

Se référer à (Vivar et al., 2015), en section Résultats.

2.14. Cytométrie en flux

Pour tous les marquages, les cellules ont été centrifugées et transférées dans des plaques à fond conique (Greiner Bio-One, 650101), marquées pendant 30 minutes en PBS avec le colorant de viabilité cellulaire Fixable Viability Dye eFluor® 780 (1/4000, eBioscience 65-0865-18) et enfin lavées en tampon FACS (PBS 0,5% BSA 2mM EDTA). Les marquages extracellulaires ont été réalisés en tampon FACS pendant 30 minutes sur glace. Pour les marquages de surface des cellules humaines, les anticorps anti-TCR α/β PE (1/20, Beckman Coulter, A39499), anti-CD3 ϵ Alexa-Fluor 647 (1/100, BD Pharmingen, 557706), et anti-CD28 PE (1/100, BD Pharmingen, 555729) ont été utilisés. Pour les analyses de la production d'IL-2, l'anticorps anti-humain CD19 PE-Cy7 (1/100, eBioscience, 25-0198) a été utilisé pour exclure les cellules B Raji de l'analyse.

Pour les analyses chez la souris, les cellules ont été marquées en tampon FACS pendant 30 minutes sur glace avec du FcBlock dans 50 μ L (1/25, BD Pharmingen, 553142). Pour les analyses des MLR, 50 μ L d'anti-CD4 APC (1/150, BD Pharmingen, 553051) et d'anti-MHC-II (I-A/I-E) APC-eFluor 780 (1/250, eBioscience, 47-5321-82) ont directement été ajoutés, et les cellules ont été incubées pendant 30 minutes sur glace avant fixation. L'analyse des cellules proliférantes a été réalisée sur les cellules vivantes MHC-II $^-$ et/ou CFSE $^-$ (pour exclure les cellules stimulatrices de BALB/c) et les lymphocytes T CD4 $^+$. Pour le phénotypage des compartiments immunitaires chez la souris, différentes combinaisons d'anticorps ont été utilisées (1/300 final) : anti-B220 FITC (BD Pharmingen, 553087), anti-CD3 ϵ APC (BD Pharmingen, 553066), anti-CD4 PerCP (BD Pharmingen, 553052), anti-CD8 α Pacific Blue (BD Pharmingen, 558106), anti-CD62L PE-Cy7 (BD Pharmingen, 560516), anti-CD44 PE (BD Pharmingen, 553134), anti-B220 APC (BD Pharmingen, 553092), anti-

TCR β -FITC (BD Pharmingen, 553171), anti-CD4 Pacific Blue (BD Pharmingen, 558107), anti-CD8 α PE-Cy7 (BD Pharmingen, 552877), anti-CD25 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, 553077), anti-B220 eFluor 450 (eBioscience, 48-0452-82), anti-CD25 FITC (BD Pharmingen, 553077), anti-CD11c PE Cy7 (BD Pharmingen, 558079), anti-I-Ab FITC (BD Pharmingen, 553551), anti-CD11b PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, 550993), anti-CD11c APC (BD Pharmingen, 550261), anti-CD28-biotinylated (1/100, BD Pharmingen, 553296) et streptavidin-PE (1/300, BD Pharmingen, 554061).

Les cellules ont été lavées en tampon FACS et fixées avec le tampon Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, 554714) pour les marquages classiques ou le tampon Fixation/Permeabilization (eBioscience, 00-5123-43 and 00-5223-56) pour le marquage du facteur de transcription FoxP3. Pour les marquages intracellulaires, les cellules ont été lavées 2 fois en tampon Perm/Wash (BD, 554723) pour la cytométrie intracellulaire classique ou en tampon Permeabilization (eBioscience, 00-8333-56) pour le marquage de FoxP3. Les marquages intracellulaires ont été réalisés dans les tampons respectifs avec les anticorps anti-humains IL-2 PE (1/50, eBioscience, 01-12-7029), anti-LAT (5 μ g/mL, R&D, MAB63341), anti-souris PE (1/300, Jackson ImmunoResearch, 115-116-146) et anti-souris FoxP3 (1/100, eBioscience, 12-5773-82).

Pour les échantillons de sang, 50 μ L de sang ont été marqués pendant 30 minutes et ont été fixés en tampon de lyse (BD, 349202). Après plusieurs lavages, les cellules ont été acquises.

Les cellules et les billes de compensation (eBioscience, 01-1111-42) ont été acquises avec les cytomètres en flux BD FACS Verse et MACS Quant (Miltenyi) et les données ont été analysées avec le logiciel Flow Jo.

2.15. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec Graph Pad Prism 7.

PARTIE 3 - RESULTATS

3.1. VAMP7 contrôle l'activation des lymphocytes T par la régulation du recrutement et de la phosphorylation de la forme vésiculaire de LAT aux sites d'activation du TCR

L'induction d'un signal TCR conduit au recrutement de compartiments intracellulaires de LAT à la synapse immunologique (Martín-Cófreces et al., 2012; Onnis et al., 2016; Soares et al., 2013a; Williamson et al., 2011). Cela suggère que ce pool intracellulaire empreinte une voie exocytique de transport à la synapse où LAT contribuerait à l'activation lymphocytaire T. Afin de tester cette hypothèse, nous avons essayé de comprendre la machinerie moléculaire impliquée dans le transport de LAT à la synapse. Les protéines de fusion membranaire SNAREs ont été décrites comme jouant un rôle dans différentes étapes du transport intracellulaire allant du bourgeonnement d'un compartiment donneur, au transport des cargos vers la périphérie et l'arrimage/fusion au compartiment accepteur (Burgo et al., 2012; Y. A. Chen and Scheller, 2001). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine v-SNARE VAMP7 dans le recrutement du compartiment vésiculaire LAT aux sites d'activation du TCR et son implication dans la réponse lymphocytaire T CD4.

3.1.1. VAMP7 contrôle le recrutement de LAT aux sites d'activation du TCR

Les fonctions de la v-SNARE VAMP7 ayant été particulièrement décrites dans des voies de transport antérograde (Burgo et al., 2012; 2009; Martinez-Arca et al., 2003a), nous avons analysé son rôle dans le recrutement de LAT à la synapse immunologique. Pour cela, l'expression de la protéine VAMP7 dans des cellules T Jurkat (**Fig.3.1.1a**) et dans des lymphocytes T primaires humains (**Fig.3.1.1f**) a été éteinte à l'aide de lentivirus codant pour des shRNAs (sh1 et sh5) spécifiques de VAMP7.

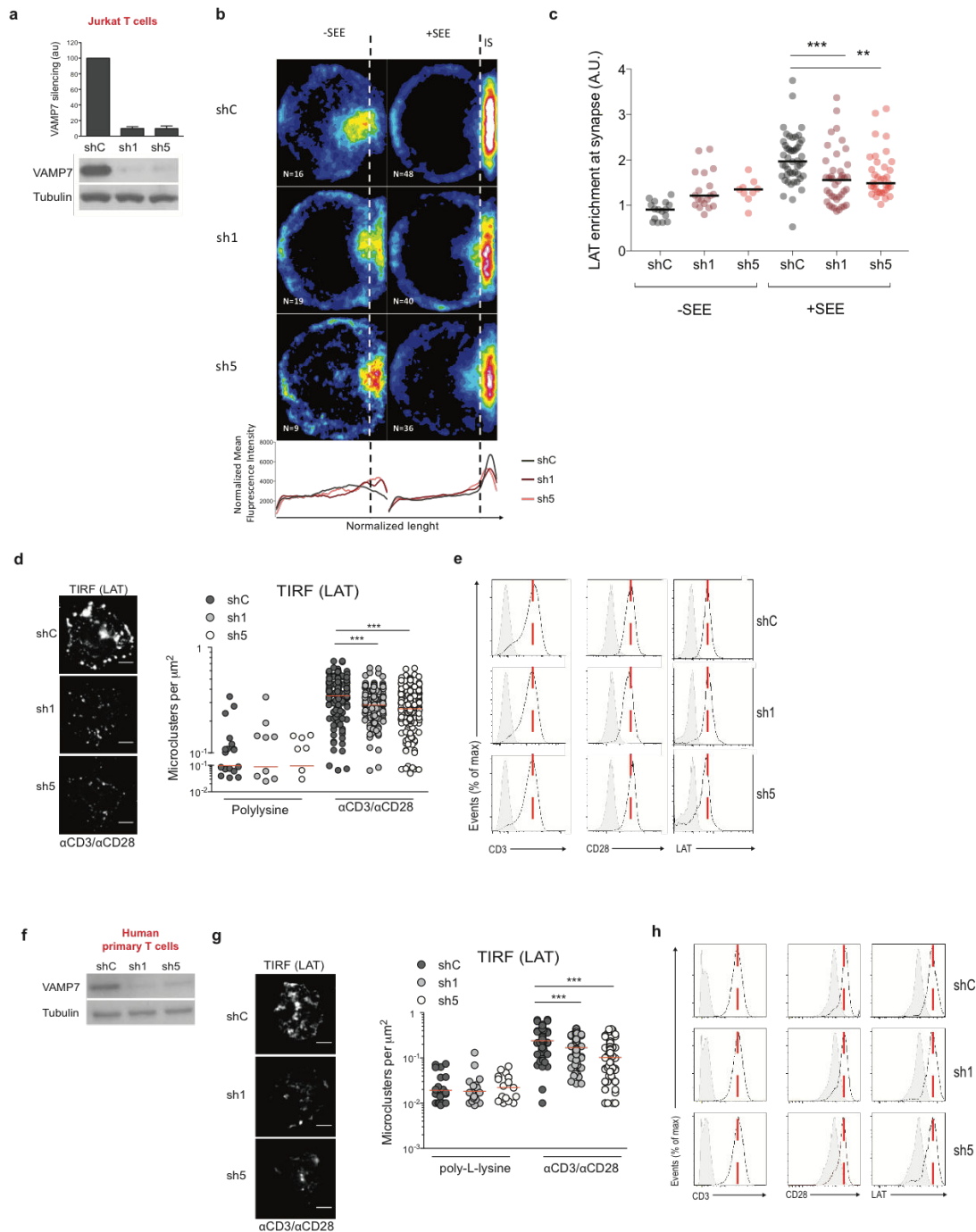


Figure 3.1.1. VAMP7 contrôle le recrutement de LAT aux sites d'activation du TCR dans les lymphocytes T humains.

(a-h) Cellules T Jurkat (a-e) ou lymphocytes T primaires humains (f-i) exprimant un shRNA contrôle (shC) ou des shRNA ciblant l'ARNm VAMP7 (sh1 et sh5). (a,f) Immunoblot montrant les protéines VAMP7 et tubuline- α (bas) dans des cellules T Jurkat et quantification de l'expression de VAMP7 normalisée avec l'expression de la tubuline- α et l'expression de VAMP7 dans le shC (haut). (b) Images confocales représentant des cellules Jurkat « moyennes » marquées pour LAT et activées avec des cellules B Raji pré-traitées ou non avec du superantigène, SEE (haut, IS, Synapse Immune et N, nombre de cellules constituant l'image moyenne). Quantification de l'intensité de fluorescence moyenne sur la longueur moyenne de la cellule (bas). (c) Quantification sur cellules individuelles (moyennées en b) de l'intensité de fluorescence moyenne de LAT à la synapse sur un plan en z, divisée par l'intensité de fluorescence moyenne de la cellule totale. Les lignes horizontales représentent la médiane. (d,g) Images TIRF de lymphocytes T incubés pendant 10min sur des lamelles recouvertes d'anticorps activateurs $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ avant fixation et marquage intracellulaire du LAT endogène (gauche) et quantification dans les conditions d'activation et contrôle (poly-L-Lysine) de la densité des microclusters LAT formés dans la zone synaptique (droite) (sur anti-CD3 ϵ /anti-CD28 :shC Jurkat, n=165 cellules ; sh1 Jurkat, n= 129 cellules ; sh5 Jurkat, n= 173 cellules ; shC primaires, n=96 cellules ; sh1 primaires, n= 137 cellules ; sh5 primaires, n= 98 cellules; sur poly-L-lysine : shC Jurkat, n=18 cellules ; sh1 Jurkat, n= 9 cellules ; sh5 Jurkat, n= 7 cellules). (e,h) Analyse de cytométrie en flux montrant l'expression de surface des molécules CD3 ϵ et CD28 et l'expression totale de LAT. Barres d'échelle : 5 μm (d,g). (a,d,g) représentent 3 expériences et (b,c,d,e,f,h) proviennent de 3 expériences. * P<0.05, ** P<0.01, **** P<0.0001; one-way ANOVA (c, médiane); Student t-test (d,g; médiane).

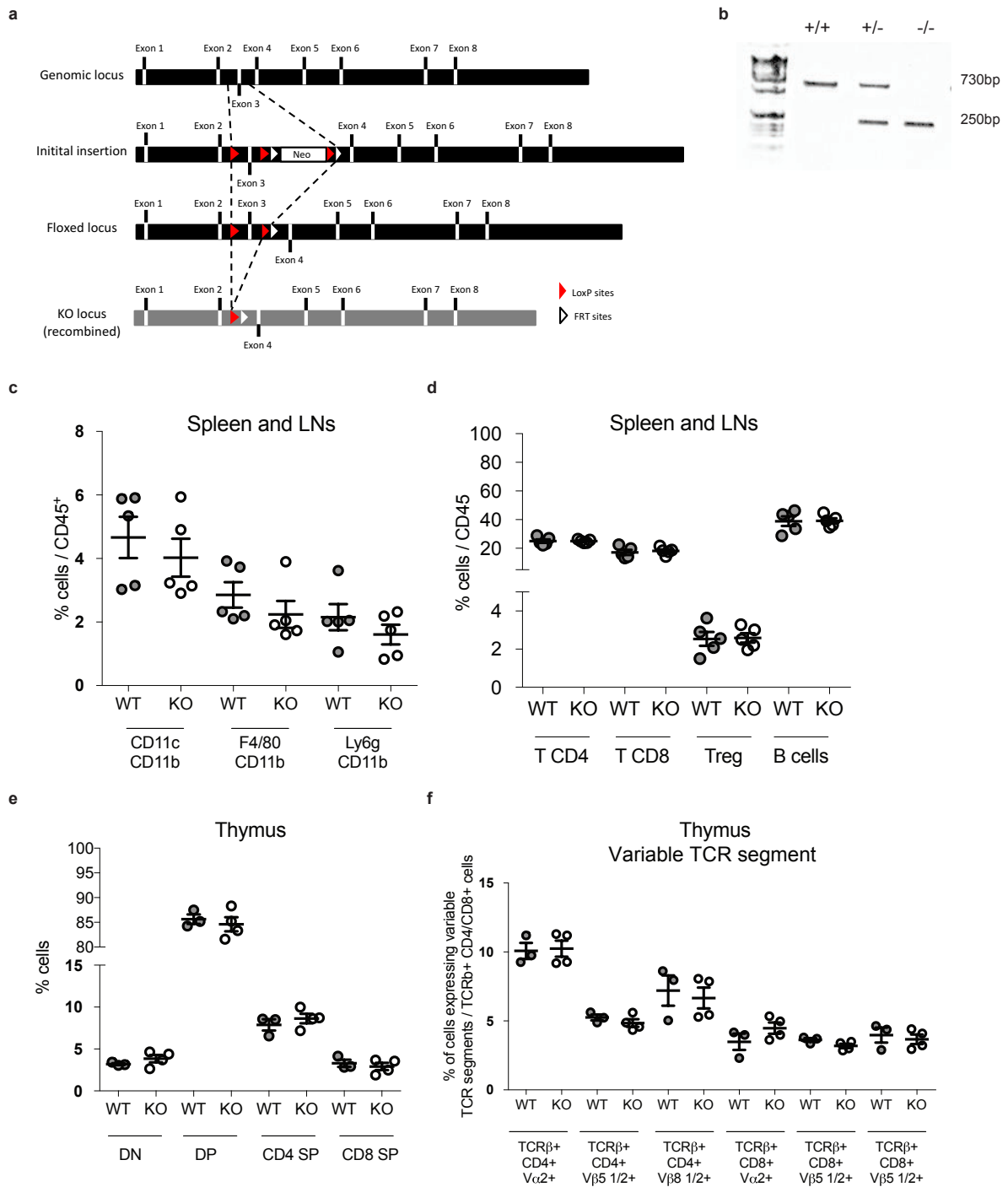


Figure 3.1.2. Caractérisation de la construction et des compartiments immunitaires des souris VAMP7 KO.

(a) Stratégie de génération des souris KO pour l'exon 3 du gène codant pour VAMP7 (gène pseudoautosomal). (b) Etat de recombinaison WT (730 paires de bases) ou muté (KO, 250 paires de bases) de l'exon 3 du gène codant pour VAMP7. (c-f) Quantification des fractions relatives des différentes populations immunitaires testées dans les organes de souris VAMP7 KO ou de souris contrôles (WT). (c) Analyse des populations myéloïdes ($CD11b^+CD11c^+$, cellules dendritiques ; $CD11b^+F4/80^+$, macrophages ; $CD11b^+Ly6G^+$, granulocytes neutrophiles) dans la rate et les ganglions lymphatiques (LNs). (d) Analyse des populations lymphoïdes ($TCR\beta^+CD4^+$, T CD4 ; $TCR\beta^+CD8^+$, T CD8 ; $TCR\beta^+CD4^+FoxP3^+$, Treg ; $CD19^+$, lymphocytes B) dans la rate et les ganglions lymphatiques (LNs). (e) Analyse des stades de développement lymphocytaire T dans le thymus (DN, double négatif ; DP, double positif ; CD4 SP, CD4 simple positif ; CD8 SP, CD8 simple positif). (f) Analyse de l'expression de différents segments variables des chaînes α et β du TCR des lymphocytes T CD8 et T CD4 dans le thymus (DN, double négatif ; DP, double positif ; CD4 SP, CD4 simple positif ; CD8 SP, CD8 simple positif).

Le recrutement de LAT à la synapse immunologique a été mesuré par microscopie confocale et analysé sur des cellules T Jurkat « moyennes » conjuguées avec des cellules B Raji chargées ou non avec du SEE. En absence de VAMP7, l'enrichissement de LAT à la zone synaptique était déficient en comparaison avec des cellules exprimant un shRNA contrôle (shC) (**Fig.3.1.1b**, quantifié en **Fig.3.1.1c**). Nous avons ensuite analysé en microscopie TIRF les cellules T Jurkat ou primaires en contact avec des lamelles recouvertes d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28. Cette approche nous a ainsi permis de quantifier l'aire d'étalement des cellules et le nombre de microclusters LAT recrutés dans le champ d'évanescence du microscope TIRF dont la profondeur est de 60nm à 200nm et comprend la membrane plasmique et la zone corticale de la synapse immunologique. Ainsi, une augmentation des densités de microclusters LAT en comparaison à des cellules disposées sur une surface non activatrice (poly-L-Lysine, **Fig.3.1.1d,g**) a pu être observée. En absence de VAMP7, le recrutement de LAT dans le champ d'évanescence (**Fig.3.1.1d,g**) était diminué par rapport aux cellules contrôles (shC), confirmant les résultats obtenus par microscopie confocale. Ces défauts n'étaient pas liés à des défauts d'expression de LAT ou bien des défauts de transport à la membrane de CD3 ϵ ou CD28 dont les expressions étaient normales en absence de VAMP7 (**Fig.3.1.1e,h**).

Afin de confirmer ces observations dans un troisième modèle, nous avons par la suite utilisé des souris invalidées pour VAMP7 (**Fig.3.1.2a,b**). Nous avons tout d'abord cherché un éventuel rôle de VAMP7 dans le développement des populations du système immunitaire, en caractérisant différents compartiments immunitaires en périphérie (rates et ganglions lymphatiques) des souris invalidées pour ce gène. Les compartiments myéloïdes testés (cellules dendritiques, CD11b⁺CD11c⁺ ; macrophages, CD11b⁺F4/80⁺ ; granulocytes neutrophiles, CD11b⁺ Ly6G⁺) tout comme les populations lymphoïdes ne présentaient pas de différences majeures entre les souris WT et KO (**Fig.3.1.2c,d**). En effet, les populations de lymphocytes B (CD45⁺TCR β ⁻CD19⁺, WT=38,9% ; KO=39,2%), de LT CD4⁺ (CD45⁺TCR β ⁺CD4⁺ ; WT=25,0% ; KO=25,0%) et de LT CD8⁺ (CD45⁺TCR β ⁺CD8⁺ ; WT=17,1% ; KO=18,1%) était comparables dans les souris WT et KO (**Fig.3.1.2d**).

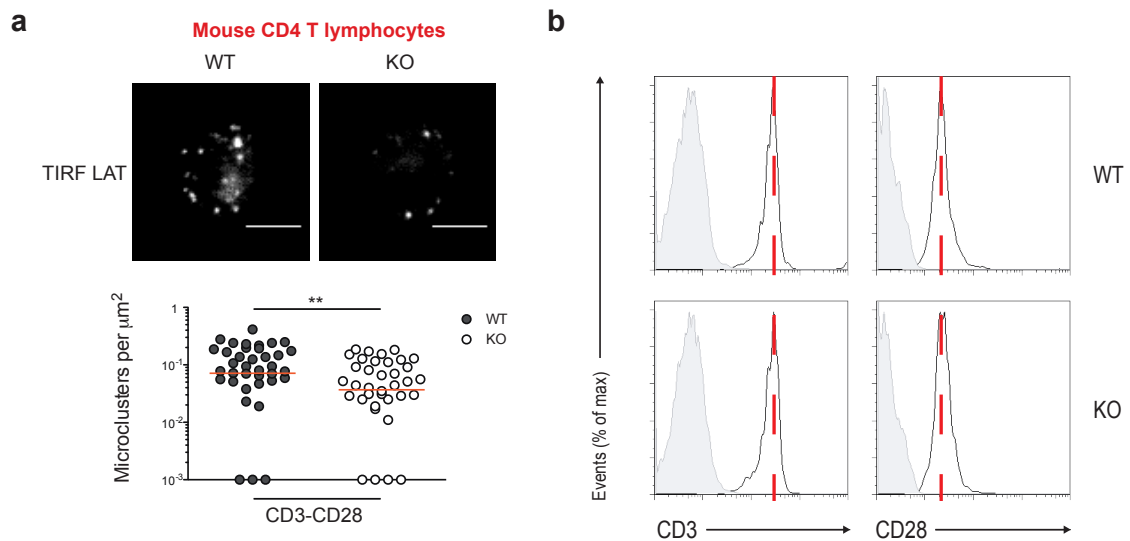


Figure 3.1.3. VAMP7 contrôle le recrutement de LAT à la synapse immunitaire dans les lymphocytes T CD4⁺ de souris.

(a) Images TIRF (haut) de LT CD4⁺ de souris WT ou VAMP7 KO déposés sur des lamelles recouvertes d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 pendant 10min avant fixation et marquage de LAT endogène, et quantification de la densité de microclusters LAT formés à la synapse immunologique (WT, n=37 cellules ; KO, n=36 cellules). (b) Analyse en cytométrie de flux de l'expression de surface des molécules CD3 ϵ et CD28. Barre d'échelle : 5 μm (a). ** P<0.01, Student's *t*-test (a, médiane). (a,b) représentent 3 expériences.

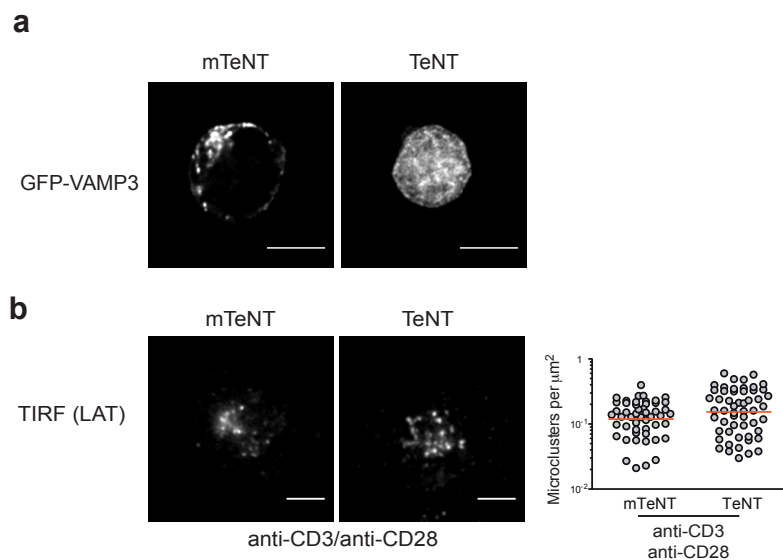


Figure 3.1.4. Le transport de LAT vers la synapse immunitaire ne dépend pas des SNAREs vésiculaires sensibles à la neurotoxine tétanique.

(a-b) Images déconvoluées de cellules T Jurkat co-exprimant GFP-VAMP3 et la chaîne légère de la neurotoxine tétanique dont l'activité protéolytique est intacte (TeNT) ou absente (mTeNT). (a) Images déconvoluées montrant GFP-VAMP3. (b) Images TIRF montrant le recrutement de LAT-mCherry à la synapse formée entre les cellules et des lamelles recouvertes d'anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 (gauche) et quantification de la densité de microclusters LAT à la synapse (droite ; mTeNT, n=54 cellules ; TeNT, n=55 cellules). Chaque symbole correspond à une cellule. Barres d'échelle, 5 μm (a,b). Les résultats sont représentatifs de 2 expériences (a) ou récapitulent 3 expériences (b).

Aucune différence significative pour les lymphocytes T régulateurs n'a été observée ($CD45^+CD4^+FoxP3^+$; WT=2,54% ; KO=2,59%). En accord avec les résultats obtenus en périphérie, nous n'avons pas observé de différence entre les souris WT et KO pour les stades de différenciation thymique double négatif (DN ; WT=3,2% ; KO=3,9%), simple positif CD4 (CD4 SP ; WT=7,9% ; KO=8,6%), simple positif CD8 (CD8 SP ; WT= 3,3% ; KO= 2,9%) et double positif (DP ; WT=85,6% ; KO=84,6%) (**Fig.3.1.2e**). Enfin, nous avons comparé les répertoires de thymocytes sauvages ou invalidés pour VAMP7 en analysant quelques segments variables des cellules $TCR\beta^+$ (**Fig.3.1.2f**). Aucune différence majeure entre les souris WT et KO n'a été mise en évidence pour ces régions variables ($CD4^+V\alpha 2^+$, WT=10,08% ; KO=10,24% ; $CD4^+V\beta 5.1/2^+$, WT=5,25% KO=4,85% ; $CD4^+V\beta 8.1/2^+$, WT=7,20% KO=6,66% ; $CD8^+V\alpha 2^+$, WT=3,49% KO=4,49% ; $CD8^+V\beta 5.1/2^+$, WT=3,62% KO=3,19% ; $CD8^+V\beta 8.1/2^+$, WT=3,97% KO=3,67%).

Nous avons poursuivi notre analyse en mesurant le recrutement de LAT à la synapse immunologique formée entre des lymphocytes T $CD4^+$ de souris invalidées pour VAMP7 (KO) et des lamelles recouvertes d'anticorps anti- $CD3\epsilon$ /anti- $CD28$. En absence de VAMP7, la densité de microclusters LAT à la synapse était diminuée par rapport aux cellules de souris contrôles (**Fig.3.1.3a**). L'expression de surface des molécules $CD3\epsilon$ et $CD28$ était normale dans les cellules T $CD4^+$ de souris en absence de VAMP7 (**Fig.3.1.3b**). Ces résultats montrent ainsi que la protéine v-SNARE VAMP7 est impliquée dans le transport de LAT à la synapse immunologique.

Les protéines v-SNAREs sont réparties en deux groupes selon leur sensibilité (VAMP1, VAMP2 et VAMP3) ou résistance (VAMP7, Ykt6, Sec22, VAMP4 et VAMP8) à la fonction protéolytique de la neurotoxine tétanique. Afin de déterminer le rôle d'autres protéines SNAREs dans le transport de LAT à la synapse immunologique, les effets de la neurotoxine tétanique ont été analysés. Les lymphocytes T n'exprimant pas le récepteur à la toxine tétanique, nous avons co-exprimé dans des cellules T Jurkat la molécule chimérique GFP-VAMP3 et la chaîne légère de la neurotoxine tétanique possédant l'activité protéolytique (TeNT) ou bien dépourvue de sa fonction

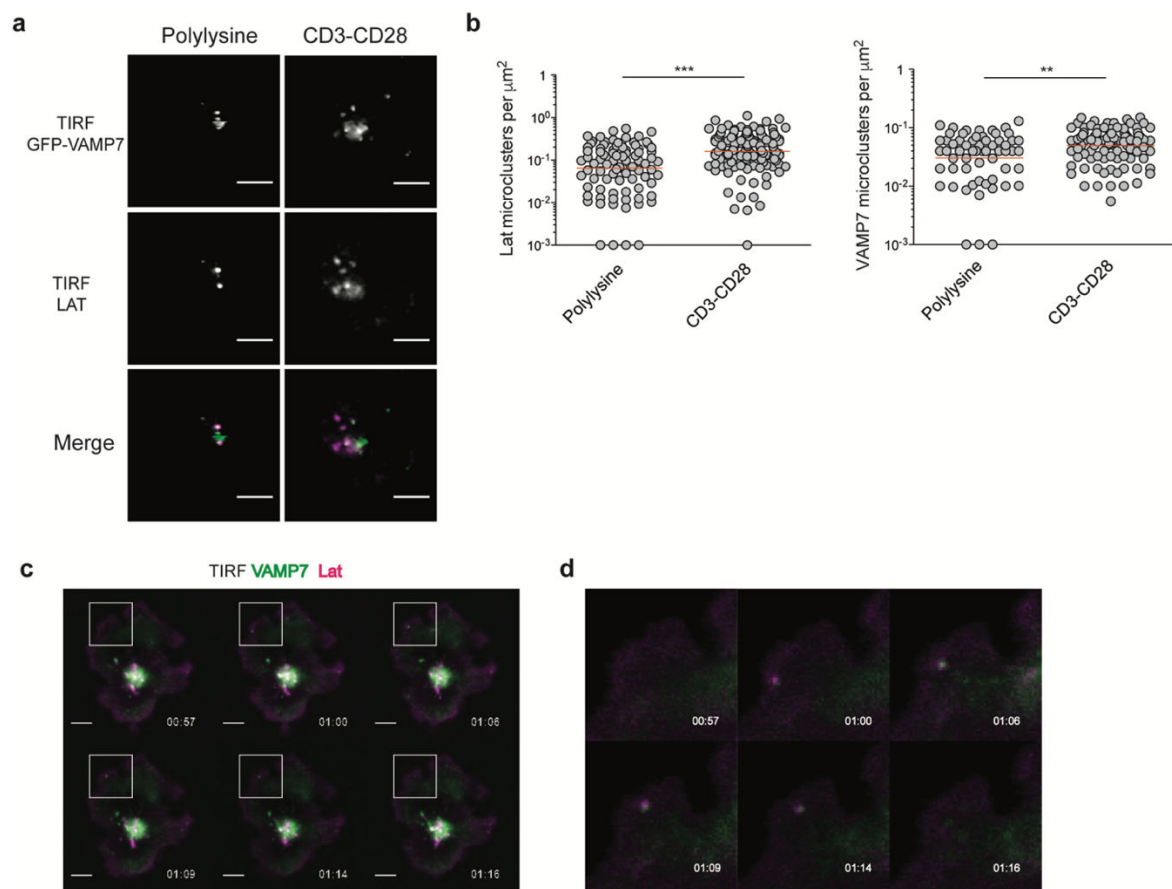


Figure 3.1.5. VAMP7 et LAT sont co-transportées à la synapse immunologique. (a-d) Les cellules T Jurkat ont été déposées sur un substrat recouvert d'anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 ou un substrat neutre (poly-L-lysine), et ont été analysées par microscopie TIRF. (a) Cellules Jurkat fixées exprimant VAMP7-GFP et marquées pour la forme endogène de LAT. (b) Quantification des densités de microclusters contenant LAT (gauche) ou VAMP7 (droite). Chaque symbole représente une cellule (LAT poly-L-lysine, n= 46 cellules ; LAT anti-CD3 ϵ /anti-CD28, n=63 cellules; VAMP7 poly-L-lysine, n= 48 cellules; VAMP7 anti-CD3 ϵ /anti-CD28, n=49 cellules). (c) « Time-lapse » de cellules Jurkat exprimant VAMP7-GFP et LAT-mCherry. (d) Agrandissement de la région encadrée en (c). Barres d'échelles, 5 μm ; Temps (minute : seconde). ** P<0.01, *** P<0.0001; Student *t*-test (b). Les données compilent 2 expériences (b, moyenne géométrique) ou sont représentatives de 3 expériences (a,c,d).

Pour visionner la vidéo, rendez-vous à cette adresse :

https://www.dropbox.com/s/pctnhzotapa2xqs/Video_Supplementaire_3_1.avi?dl=0

Video 3.1. Trafic de LAT et VAMP7 à la synapse immunologique. « Time-lapse » réalisé par microscopie TIRF sur des cellules Jurkat vivantes exprimant LAT-mCherry (rouge) et VAMP7-GFP (vert) étalées sur un substrat recouvert d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28.

protéolytique par mutation ponctuelle (mTeNT). Dans les conditions non protéolytiques, la protéine GFP-VAMP3 était présente dans des compartiments intracellulaires tandis qu'en présence de TeNT, le signal de la GFP était relocalisé dans le cytoplasme de toute la cellule signant le clivage de VAMP3 (**Fig.3.1.4a**). Cependant, ce clivage induit par la TeNT n'a pas occasionné de diminution du recrutement de LAT à la synapse immunologique par microscopie TIRF excluant le rôle des v-SNAREs sensibles à la TeNT dans le recrutement du pool intracellulaire de LAT à la synapse (**Fig.3.1.4b**). A l'inverse, une augmentation de la densité des microclusters LAT en présence de TeNT a été observé. Cette accumulation de LAT à la membrane plasmique ou dans la zone corticale de la membrane plasmique pourrait s'expliquer par le fait que les protéines SNAREs sensibles à TeNT pourrait être impliquées dans des étapes d'internalisation de LAT ou bien dans la fusion de vésicules LAT à la membrane plasmique.

3.1.2. VAMP7 et LAT sont co-transportées à la synapse immunologique

Le transport de LAT à la synapse immunologique étant dépendant de VAMP7, nous avons analysé leur localisation respective à la synapse immunologique. La molécule chimérique GFP-VAMP7, exprimée dans des cellules T Jurkat, était recrutée dans la zone synaptique dans les conditions activatrices anti-CD3 ϵ /anti-CD28 et colocalisait partiellement avec la protéine LAT endogène (**Fig.3.1.5a,b**). Afin de caractériser plus précisément la relation entre LAT et VAMP7 à la synapse immunologique, leur dynamique de transport a été analysée en vidéomicroscopie TIRF. Ainsi, des cellules Jurkat exprimant mCherry-LAT et GFP-VAMP7 ont été déposées sur des surfaces recouvertes d'anticorps activateurs et les images ont été acquises après l'étalement des cellules. Les molécules chimériques colocalisaient au niveau d'un compartiment central de la synapse immunologique (**Fig.3.1.5c** et **Vidéo 3.1**) et des vésicules isolées portant LAT et VAMP7 apparaissaient plus en périphérie pendant une dizaine de secondes puis disparaissaient du champ d'évanescence TIRF (**Fig.3.1.5c,d** et **Vidéo 3.1**). Ces résultats démontrent que VAMP7 et LAT sont co-

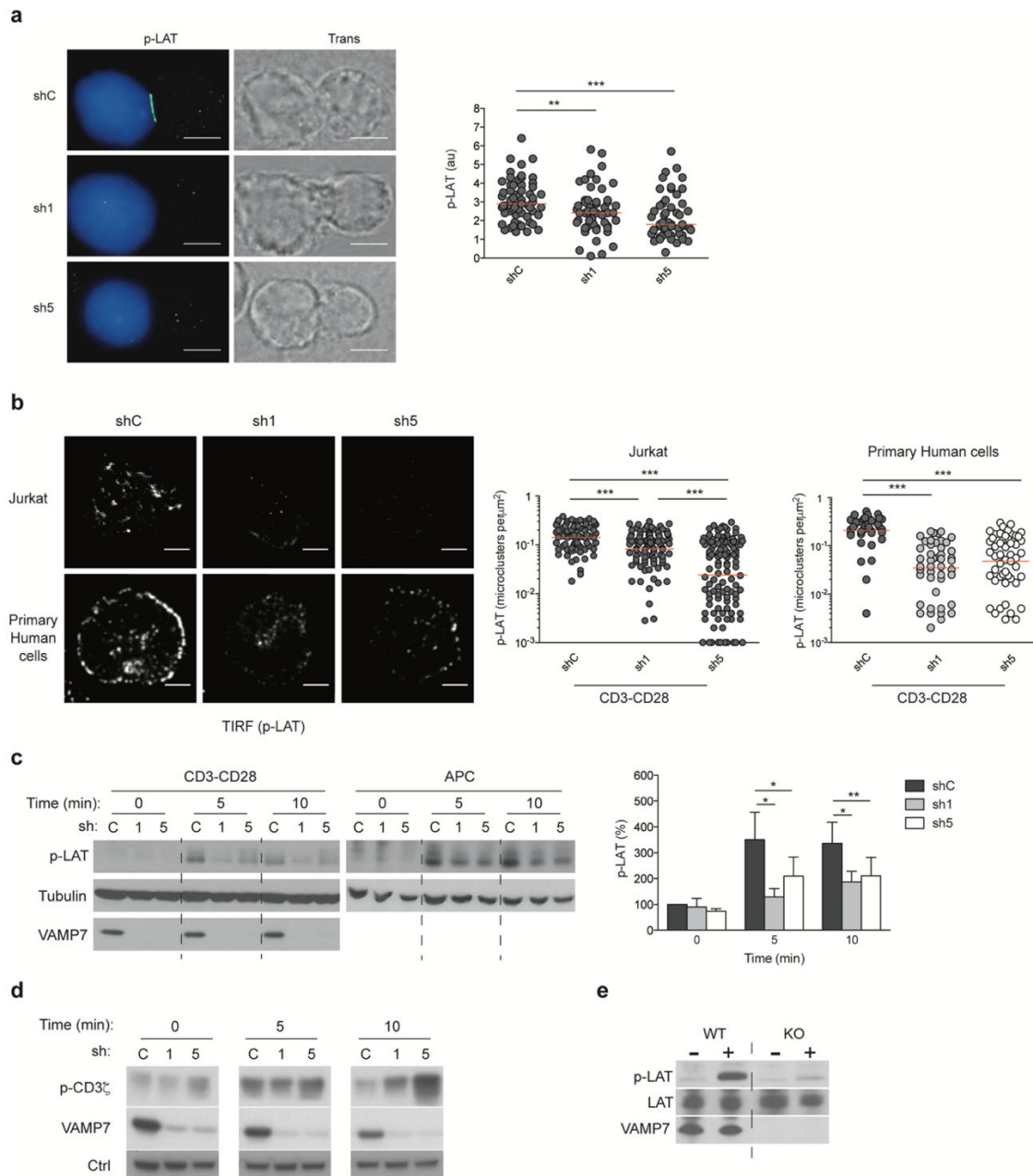


Figure 3.1.6. VAMP7 contrôle la phosphorylation de LAT après l'induction du TCR. (a) Images déconvoluées de cellules T Jurkat exprimant un shRNA contrôle (shC) ou des shRNA spécifiques de VAMP7 (sh1 et sh5) et conjuguées pendant 30 minutes avec des cellules B Raji pulsées avec du SEE (bleues). La fraction phosphorylée de LAT a été marquée (gauche) et les intensités moyennes de fluorescence à la synapse (droite) ont été quantifiées sur deux plans de chaque cellule et divisées par les intensités moyennes de fluorescence de la cellule entière mesurée aux mêmes plans (shC Jurkat, n=61 cellules ; sh1 Jurkat, n= 55 cellules ; sh5 Jurkat, n= 64 cellules ; shC primaires, n=42 cellules ; sh1 primaires, n= 46 cellules ; sh5 primaires, n= 51 cellules). (b) Images TIRF (gauche) de cellules T Jurkat ou de lymphocytes T CD4⁺ primaires humains exprimant les shRNA contrôle et spécifiques de VAMP7, déposées sur des lamelles recouvertes d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ et anti-CD28 pendant 10 min, avant d'être marquées pour la fraction phosphorylée de LAT. Quantification de phospho-LAT dans le champ d'évanescence du microscope TIRF, exprimé en microclusters/ μm^2 (droite). (c) Immunoblot montrant l'état phosphorylé de LAT, l'expression de la tubuline- α et VAMP7 dans les cellules T Jurkat dont l'expression de VAMP7 a été éteinte (1 et 5) ou non (C). Les cellules ont été activées pendant différents temps avec des anticorps solubles anti-CD3 ϵ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et anti-CD28 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (gauche) ou avec des cellules B Raji en présence de SEE (100ng/mL). Quantification du signal phospho-LAT normalisé par l'expression de la tubuline- α et l'intensité du signal phospho-LAT dans le shC non stimulé (droite). (d) Immunoblot montrant l'état phosphorylé de CD3 ζ , l'expression de VAMP7 et d'un contrôle de charge dans des cellules T Jurkat activées pendant différents temps avec des anticorps solubles anti-CD3 ϵ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et anti-CD28 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (e) Immunoblot montrant la phosphorylation de LAT, l'expression de LAT et de VAMP7 dans des lymphocytes T CD4⁺ activés pendant 4 minutes avec des anticorps solubles anti-CD3 ϵ (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et anti-CD28 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Barres d'échelle, 5 μm (a,b) ; Chaque symbole représente une cellule (a,b). ** P<0.01, *** P<0.0001; Student *t*-test. Les données compilent 3 expériences (a ; moyenne géométrique), 2 expériences (b ; moyenne géométriques), 8 expériences (c ; moyenne et s.e.m.) ou sont représentatives de 8 expériences (d) et 3 expériences (e).

transportées à la synapse immunologique et avec les résultats précédant suggèrent que VAMP7 contrôle directement le transport des vésicules LAT à la synapse immunologique.

3.1.3. VAMP7 contrôle la phosphorylation de LAT induite par le TCR

Afin de déterminer si la v-SNARE VAMP7 est requise pour la phosphorylation de LAT, nous avons conjugué des cellules B Raji chargées ou non avec du superantigène (SEE, 100ng/mL) et des cellules T Jurkat pour lesquelles l'expression de VAMP7 a été éteinte. En absence de VAMP7, la phosphorylation de LAT était diminuée par rapport au shC (**Fig.3.1.6a**) et ces défauts de phosphorylation ont pu être confirmés à la synapse dans des cellules Jurkat étalées sur des lamelles recouvertes d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 (**Fig.3.1.6b**). Par ailleurs, les analyses par immuno-blot des cellules activées avec des anticorps activateurs solubles ou bien avec des cellules Raji B pulsées avec superantigène SEE ont également démontré des défauts de phosphorylation de LAT lorsque l'expression de VAMP7 était inhibée (**Fig.3.1.6c**). Ces défauts n'étaient pas dus à un défaut de phosphorylation de la molécule adaptatrice CD3 ζ qui se trouve en amont de LAT (**Fig.3.1.6d**). Enfin, la phosphorylation de LAT dans des lymphocytes T CD4⁺ de souris VAMP7 KO activés avec des anticorps activateurs solubles était également déficiente (**Fig.3.1.6e**). Ainsi, ces résultats indiquent que VAMP7 est nécessaire à la phosphorylation de LAT après activation induite par le TCR et suggère donc un rôle du transport vésiculaire de LAT dans cette phosphorylation.

3.1.4. La protéine VARP associée à VAMP7 est impliquée dans le transport de LAT à la synapse immunologique

La protéine VARP est une molécule effectrice de Rab21 (X. Zhang et al., 2006) et est impliquée dans les neurones dans la régulation de la voie de transport associée à VAMP7 (Burgo et al., 2012; 2009). Afin de confirmer que cette voie de transport est

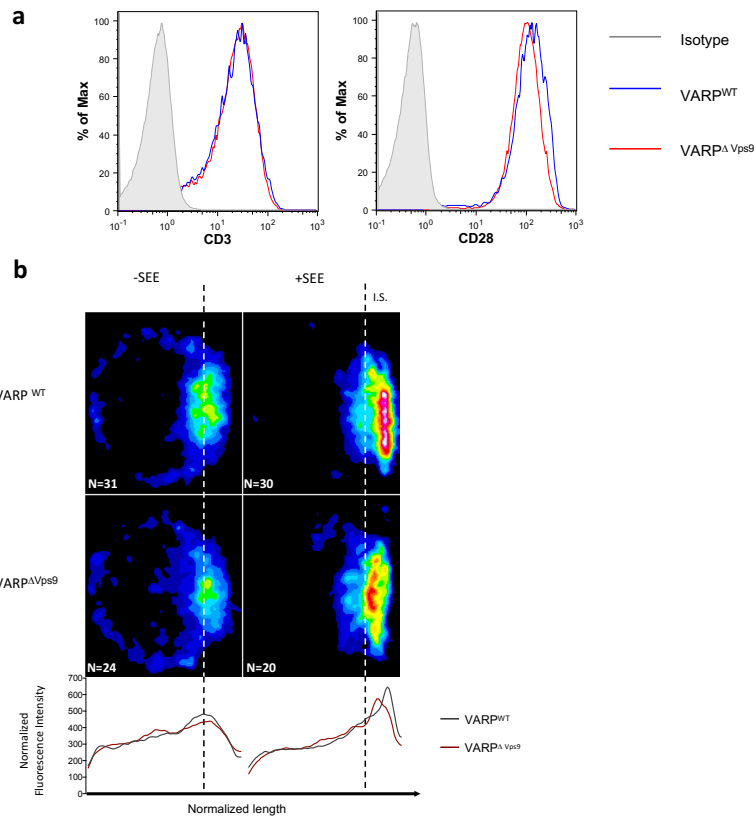


Figure 3.1.7. L'interaction VARP-Rab21 contrôle la phosphorylation de LAT à la synapse immunologique. (a-b) Cellules T Jurkat exprimant des constructions codant pour la forme sauvage de VARP-GFP (VARP^{WT}) ou la forme mutée (VARP^{ΔVps9}) incapable d'interagir avec Rab21. Les cellules GFP⁺ ont été analysées. (a) Analyse par cytométrie en flux montrant l'expression de surface des molécules CD3 ϵ et CD28. (b) Images confocales représentant le marquage de la forme phosphorylée de LAT (Y191) dans des cellules Jurkat « moyennes » activées avec des cellules B Raji pré-traitées ou non avec du superantigène, SEE (haut, IS, Synapse Immune et N, nombre de cellules constituant l'image moyenne). Quantification de l'intensité de fluorescence moyenne sur la longueur moyenne de la cellule (bas). (a,b) sont représentatives de 2 expériences.

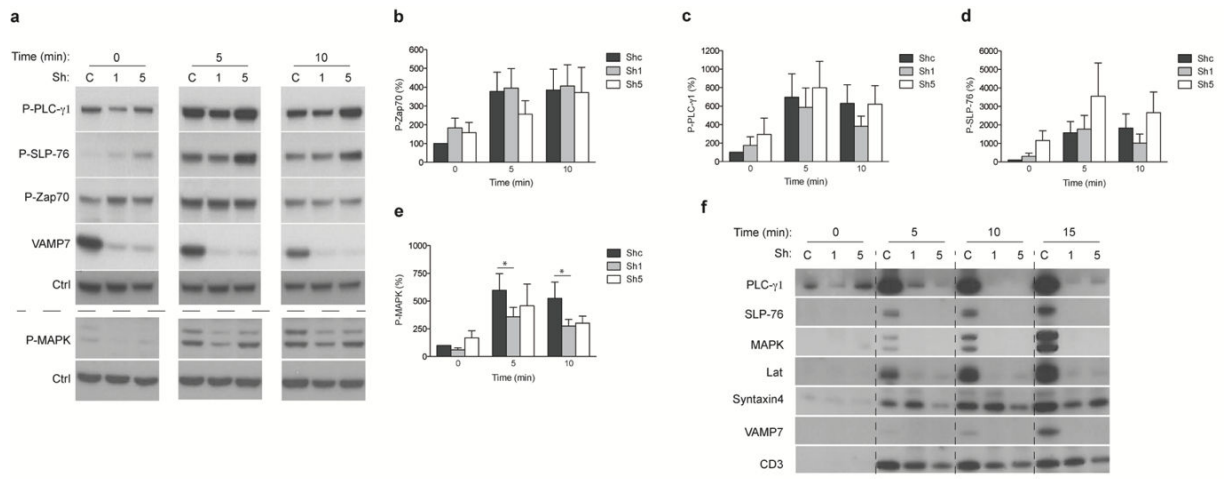


Figure 3.1.8. VAMP7 contrôle la formation des signalosomes LAT. (a-f) Cellules T Jurkat exprimant un shRNA contrôle (shC) ou deux shRNA spécifiques de VAMP7 (sh1 et sh5). (a) Immunoblot montrant la phosphorylation de PLC γ 1, SLP-76, ZAP-70 et MAPK (ERK1/2) dans les cellules T Jurkat activées pendant différents temps avec les anticorps solubles anti-CD3 ϵ (125ng/mL) et anti-CD28 (250ng/mL) (Ctrl, contrôle de charge). (b-e) Quantification des intensités de signal pour phospho-ZAP-70 (b), phospho-PLC γ 1 (c), phospho-SLP-76 (d), phospho-MAPK (ERK1/2) (e) normalisées par l'intensité du signal du contrôle de décharge et celle du shC non stimulé. (f) Immunoblot montrant le recrutement de PLC γ 1, SLP-76, MAPK (ERK1/2), LAT, syntaxin-4, et VAMP7 au signalosome CD3 ϵ /CD28 dans des cellules T Jurkat activées avec des billes magnétiques anti-CD3 ϵ /anti-CD28 pendant 5, 10 ou 15 minutes, ou 15 minutes avec des billes magnétiques recouvertes avec un isotype contrôle (0) avant d'être lysées. Les protéines attachées aux billes ont été purifiées par tri magnétique. * P<0.05; Student *t*-test. Les résultats sont représentatifs de 4 à 7 expériences (a) ou 3 expériences (f) ou récapitulent 7 expériences (b,e ; moyenne, s.e.m.) ou 4 expériences (c,d ; moyenne, s.e.m.).

impliquée dans l'activation de LAT, les formes sauvage de VARP ou mutée au niveau de son domaine GEF nécessaire à la fonction de Rab21 (Δ Vps9) (Hesketh et al., 2014) ont été exprimées dans des cellules T Jurkat. L'expression des molécules CD3 ϵ et CD28 nécessaires à l'activation et mesurée par cytométrie en flux était normale dans les cellules exprimant la forme dominante négative de VARP (**Fig.3.1.7a**). Par ailleurs, l'analyse en microscopie confocale de cellules Jurkat « moyennes » activées avec des cellules Raji pulsées ou non avec SEE a révélé un défaut de phosphorylation de LAT à la synapse immunologique (**Fig.3.1.7b**). Ces résultats appuient les résultats obtenus avec des shRNAs spécifiques de VAMP7 et démontrent que le recrutement de LAT à la synapse immunologique nécessite une voie exocytique dépendante de VAMP7, Rab21 et VARP.

3.1.5. VAMP7 contrôle la formation du signalosome LAT

La protéine de signalisation LAT est décrite pour ses fonctions de coordination et de régulation du signal venant du TCR (Finco et al., 1998; Roncagalli et al., 2014). Nous avons donc analysé la cascade de signalisation associée à LAT dans des cellules Jurkat exprimant les shRNAs spécifiques de VAMP7 et activées avec des anticorps solubles anti-CD3 ϵ /anti-CD28 pendant différents temps. En absence de LAT, la protéine kinase ZAP-70 nécessaire à la fonction de LAT était phosphorylée normalement indiquant que VAMP7 n'est pas impliquée dans la signalisation en amont de LAT (**Fig.3.1.8a,b**). De plus, bien que la phosphorylation de LAT était déficiente en absence de VAMP7 dans les conditions d'activation (**Fig.3.1.6c**), aucune perturbation majeure n'a été constatée dans l'état de phosphorylation de PLC γ 1 et de SLP-76 (**Fig.3.1.8a,c,d**) (Finco et al., 1998; W. Zhang et al., 1998). Cependant, la phosphorylation des protéines MAPKinases ERK1/2 était diminuée dans les cellules Jurkat dont l'expression de VAMP7 est diminuée (**Fig.3.1.8e**). Il est particulièrement surprenant que SLP-76 et PLC γ 1, dont l'activation a été montré comme dépendante de LAT, ne présente pas de défaut de phosphorylation alors que celle de ERK1/2 est

déficiente. Cela suggère que la signalisation induite par le TCR n'est pas linéaire et que plusieurs signalisations peuvent être différentiellement coordonnées comme le suggère les travaux de L.E. Samelson (Kortum et al., 2013a). Je discuterai plus amplement ce point dans la **partie 4.2.1.2**.

LAT est une molécule d'échafaudage à laquelle s'associe différentes molécules de signalisation pour former un signalosome LAT (Roncagalli et al., 2014). Nous avons analysé le rôle de VAMP7 dans la formation de ce signalosome. Pour cela, nous avons activé des cellules Jurkat exprimant des shRNA spécifiques de VAMP7 ou bien exprimant un shRNA contrôle avec des billes magnétiques couvertes d'anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 pendant différents temps. Les conjugués billes/cellules ont été retenus sur un aimant et ont fait l'objet de plusieurs cycles de congélation/décongélation afin de « casser » les cellules et de récupérer le complexe de signalisation associé aux membranes portant les molécules CD3 ϵ et CD28. L'analyse par immuno-blot du signalosome de cellules contrôles a permis de révéler comme attendu un recrutement de LAT et de ses molécules associées au cours du temps (**Fig.3.1.8f**). En absence de VAMP7, LAT n'était pas recrutée au signalosome et bien que certaines de ses molécules associées (PLC γ 1, SLP-76) ne présentaient pas de défaut majeur de phosphorylation (**Fig.3.1.8a-e**), leurs recrutements aux sites d'activation du TCR étaient déficients. Cela confirme le rôle important joué par VAMP7 dans le recrutement des vésicules LAT aux sites d'activation du TCR. Enfin, nous avons pu également observer l'enrichissement progressif au signalosome de VAMP7 et d'une de ses t-SNAREs partenaires (Martinez-Arca et al., 2003b; Rao et al., 2004b), la syntaxine-4 (**Fig.3.1.8f**), suggérant qu'un complexe SNARE VAMP7/syntaxine-4 est formé aux sites d'activation du TCR

3.1.6. VAMP7 contrôle l'activation induite par le TCR des lymphocytes T

LAT joue un rôle central dans l'activation lymphocytaire T tardive. Afin de tester le rôle de VAMP7 dans la réponse T, nous avons analysé la sécrétion d'IL-2 dans des cellules

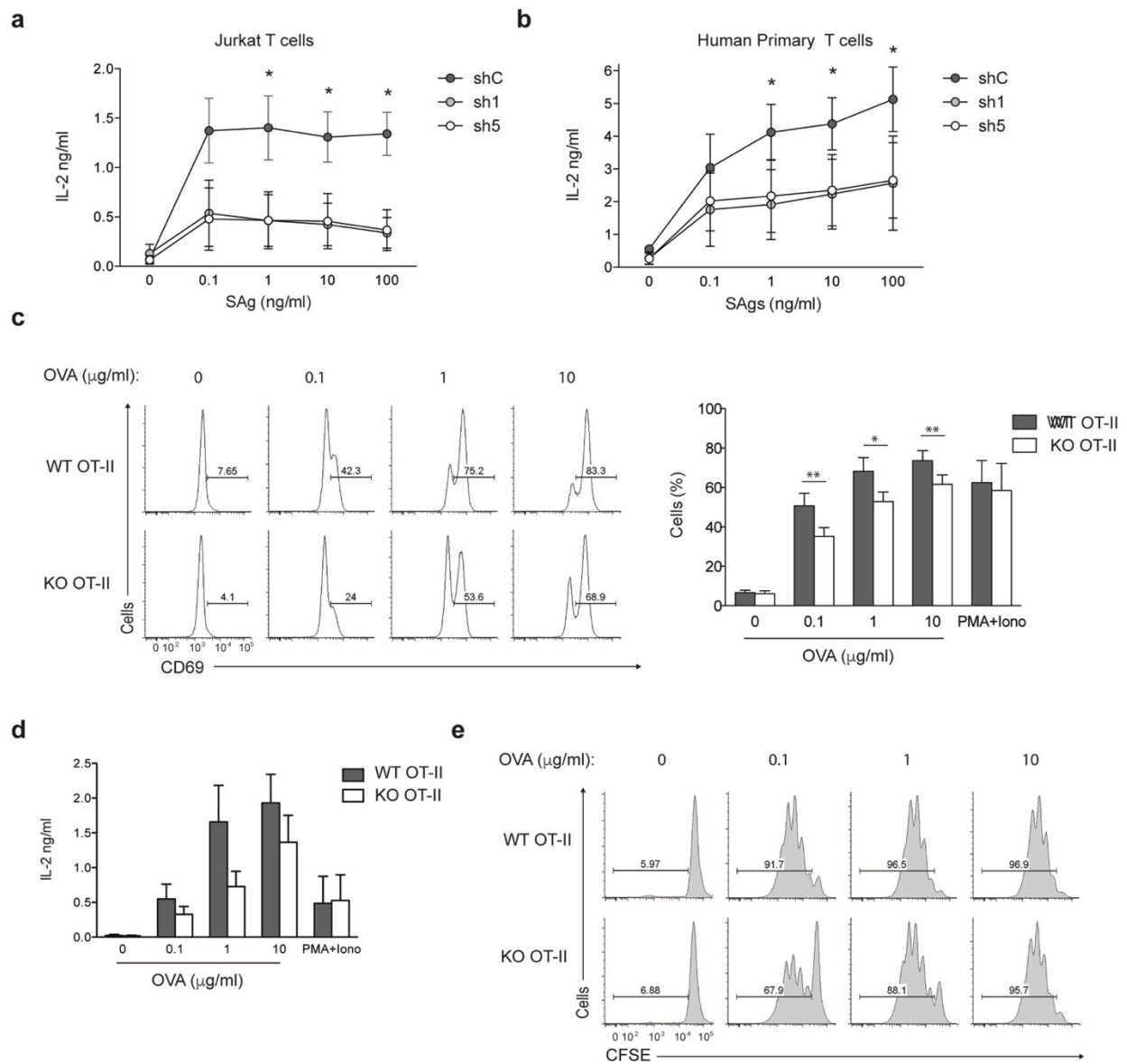


Figure 3.1.9. VAMP7 contrôle la réponse lymphocytaire T induite par le TCR. (a-b) Mesure par ELISA de la sécrétion d'IL-2 dans des lymphocytes T exprimant un shRNA contrôle (shC) ou des shRNA ciblant l'ARNm de VAMP7 (sh1 et 5) (a) Cellules T Jurkat activées pendant 6h avec des cellules B Raji en présence de différentes concentrations de SEE. (b) Lymphocytes T CD4⁺ primaires humains activés avec des cellules dendritiques dérivées de sang humain en présence de différentes concentrations d'un cocktail de superantigènes (SEE, SEB, TSST1). (c-e) Lymphocytes T CD4⁺ OT-II VAMP7 WT ou KO marqués avec un colorant de prolifération (CFSE) et activés avec des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse en présence de différentes concentrations de peptides de classe-II (OVA₃₂₃₋₃₃₉). (c) Histogrammes représentatifs de l'expression du marqueur précoce d'activation CD69 analysée par cytométrie en flux après 20h d'activation (gauche) et quantification du pourcentage de cellules T CD4⁺ CD69⁺ (droite). (d) Analyse par ELISA de la sécrétion d'IL-2 après 20h d'activation. (e) Analyse par cytométrie en flux après 72h de culture de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺. Les nombres représentent le pourcentage de cellules CD4⁺ entrées en prolifération. * P<0.05, ** P<0.01; Student *t*-test. Les résultats sont représentatifs de 4 expériences (e) ou compilent 3 expériences (a,b ; moyenne, s.e.m.) ou 5 expériences (c,d ; moyenne, s.e.m.).

T Jurkat et des lymphocytes T humains primaires dont l'expression de VAMP7 a été préalablement éteinte. L'activation de ces cellules avec respectivement des cellules B Raji et des cellules dendritiques humaines pulsées avec du superantigène a permis de révéler une diminution de la sécrétion d'IL-2 lorsque VAMP7 n'était pas exprimée (**Fig.3.1.9a,b**).

Nous avons ensuite activé des lymphocytes T CD4⁺ exprimant le TCR transgénique OT-II spécifique du peptide antigénique OVA₃₂₃₋₃₃₉ dans le contexte I-Ab à l'aide de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse. L'expression du marqueur précoce d'activation CD69 (**Fig.3.1.9c**) et la sécrétion d'IL-2 (**Fig.3.1.9d**) 20h après activation étaient diminuées dans les LT CD4⁺ KO par rapport aux cellules WT. Les cellules stimulées avec PMA/Ionomycine ne présentaient pas de différence signant un défaut précoce d'activation (**Fig.3.1.9d**). Enfin, nous avons marqué les LT CD4⁺ WT et KO avec le marqueur de prolifération CFSE qui se lie de manière covalente aux protéines du cytosol et nous a permis d'analyser sa dilution au cours de la division cellulaire. Nous avons ainsi constaté 72h après activation une diminution de la prolifération des LT CD4⁺ déficients pour VAMP7 aux faibles doses de peptides antigéniques (0,1 et 1µg/mL) (**Fig.3.1.9e**).

Ces résultats démontrent que VAMP7 est requise dans la réponse tardive des LT CD4⁺ humains et de souris lors d'une activation par le TCR.

3.1.7. Conclusions

Les conclusions apportées par cette étude sont les suivantes :

- VAMP7 et LAT sont co-transportées à la synapse immunologique et un défaut du recrutement de LAT à la synapse est observé en absence de VAMP7 chez l'homme et la souris. Il est possible qu'en absence de VAMP7, LAT soit retenue dans un compartiment intracellulaire. Les défauts observés sur le transport de LAT ne sont pas liés à des défauts d'expression à la membrane plasmique des molécules activatrices CD3 ϵ et CD28 ou encore à un défaut général d'expression de LAT (**Fig.3.1.1,3**).

- VAMP7 et sa protéine associée VARP contrôlent la phosphorylation de LAT à la synapse immunologique (**Fig.3.1.6,7**).
- VAMP7 ainsi qu'une de ses partenaires t-SNARE (syntaxine-4) est recrutée au signalosome TCR/CD28. En absence de VAMP7, bien que la signalisation ne soit pas déficiente pour certaines molécules « en aval » de LAT (PLC γ 1 et SLP76), le signalosome TCR/CD28 n'est pas formé correctement, ce qui suggère que la signalisation à la synapse immunologique ne s'organise pas en une cascade linéaire (**Fig.3.1.8**).
- VAMP7 contrôle la réponse lymphocytaire T tardive chez l'homme (sécrétion d'IL-2) et la souris (sécrétion d'IL-2, expression du marqueur d'activation CD69 et prolifération) (**Fig.3.1.9**).

Nous proposons ici un modèle dans lequel l'activation lymphocytaire T ne dépend pas seulement de la fraction présente à la membrane plasmique mais aussi de la fraction intracellulaire de LAT. La protéine v-SNARE VAMP7 joue un rôle fonctionnel dans le transport du pool intracellulaire de LAT à la synapse immunologique ainsi que dans l'activation globale des lymphocytes T. VAMP7 a été décrite dans différentes étapes du transport intracellulaire du TGN à la périphérie cellulaire (Burgo et al., 2012; 2009) et plusieurs éléments de régulation de VAMP7 ont été rapportés (Kent et al., 2012; Schäfer et al., 2012; Vivona et al., 2010). Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent être posées quant au rôle de VAMP7 dans le transport de LAT : **(i)** le tri des cargos LAT en partance du TGN, **(ii)** le transport des vésicules LAT *via* le cytosquelette de microtubules, **(iii)** la fusion des vésicules LAT avec des endosomes de signalisation ou encore **(iv)** l'arrimage et/ou la fusion des vésicules à la zone synaptique.

3.1.8. Contributions

Ce projet a principalement été mené par Paola Larghi avec qui j'ai travaillé dès mon arrivée dans l'équipe de Claire (2011). J'ai ainsi contribué à l'analyse des compartiments immunitaires à la périphérie ainsi qu'au développement thymique dans

les souris VAMP7 KO. J'ai également participé à l'analyse du recrutement de LAT à la synapse par microscopie TIRF, ainsi qu'à l'étude de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ par biochimie et dans le système transgénique OT-II.

Ce travail a fait l'objet d'un article « VAMP7 controls T cell activation by regulating the recruitment and phosphorylation of vesicular LAT at TCR-activation sites » publié en 2013 dans *Nature Immunology*.

3.2. Le recrutement de LAT à la synapse immune et l'activation lymphocytaire T requiert un transport rétrograde dépendant de Rab6.

Nous avons préalablement montré en **partie 3.1**, que LAT suit une voie antérograde de transport vers la synapse immunologique qui est régulée par la protéine v-SNARE VAMP7 (Larghi et al., 2013). Nos résultats suggèrent également que la protéine VARP, qui interagit directement avec VAMP7 et régule plusieurs de ses fonctions, est également impliquée dans le recrutement de LAT à la synapse immune. Or, les fonctions associées de VAMP7 et VARP ont été décrites dans le transport entre le TGN et la périphérie cellulaire (Burgo et al., 2012; 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'appareil de Golgi joue un rôle dans le transport de LAT.

3.2.1. La fraction de LAT à la membrane plasmique est internalisée et recycle à la synapse immunologique

Afin de mieux caractériser le transport de LAT au sein des lymphocytes T nous avons co-marqué LAT et différents marqueurs de compartiments intracellulaires dans des cellules T Jurkat. A l'état de repos, nous avons observé une colocalisation importante de LAT avec les marqueurs de compartiments endosomaux Rab11 (endosomes de recyclage) et, à moindre mesure, avec Rab5 (endosomes précoces) (**Fig.3.2.1a**). Ces observations sont en accord avec la littérature qui décrit LAT dans des compartiments TfR⁺ (Bonello et al., 2004) ou encore l'association de LAT dans les cellule T au repos avec le TfR⁺ (Roncagalli et al., 2014). Par ailleurs, seules de faibles colocalisations avec le marqueur golgien Rab6 et le marqueur lysosomal LAMP1 ont été observées (**Fig.3.2.1a**). Après activation des cellules Jurkat avec les cellules B Raji chargées avec du superantigène SEE, LAT était redistribuée à la synapse immunologique alors que les compartiments endosomaux, golgiens et lysosomaux, bien que polarisés vers la synapse immunologique, restaient en arrière du marquage de LAT. Nous avons ensuite réalisé une expérience d'internalisation d'anticorps anti-

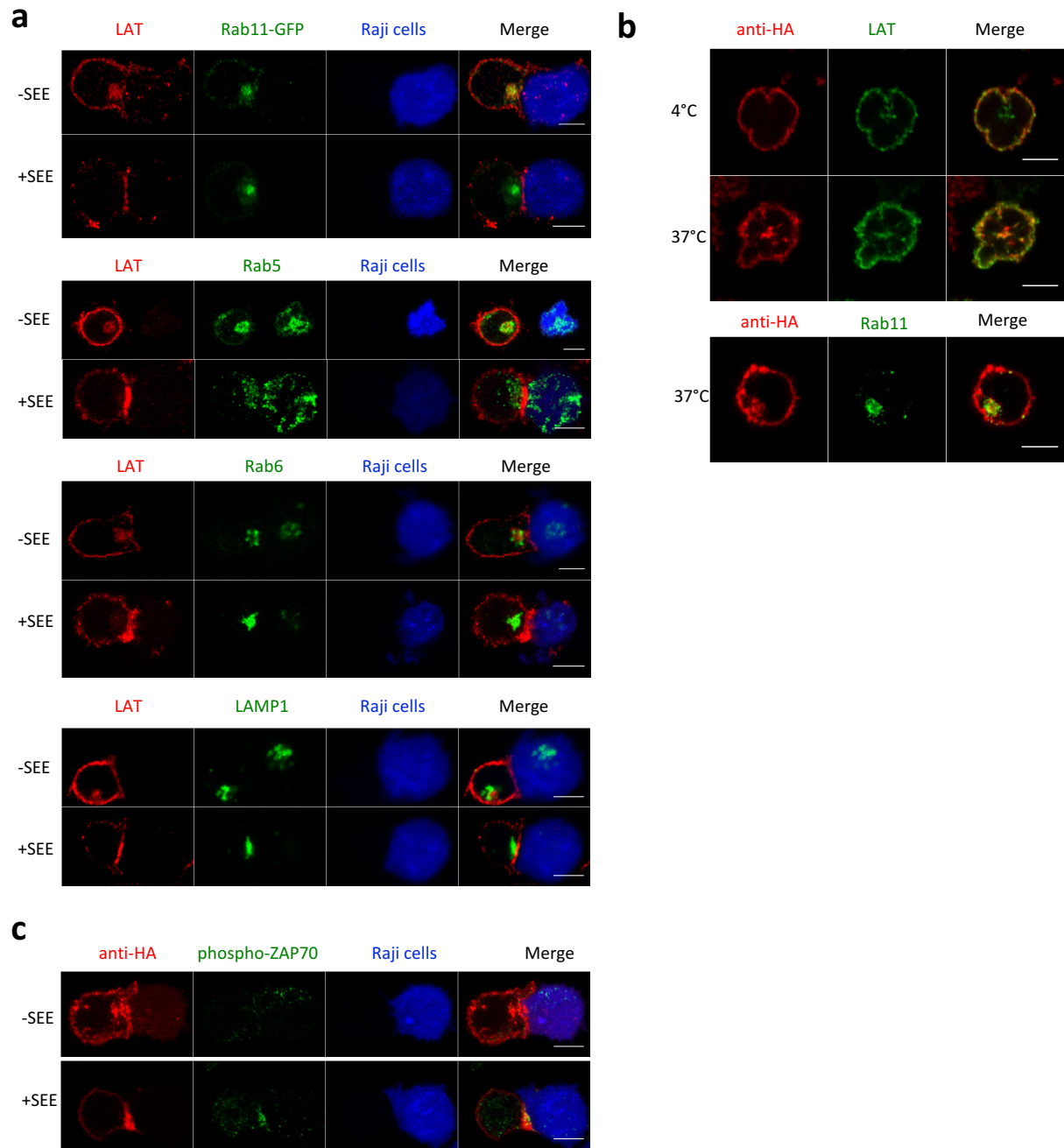


Figure 3.2.1. La fraction intracellulaire de LAT est contenue dans des compartiments endocytiques et recycle à la synapse immunologique. (a-c) Images confocales de cellules T Jurkat conjuguées ou non avec des cellules B Raji +/-SEE. Barres d'échelle : 5μm. (a) Analyse des localisations relatives du LAT endogène avec Rab11-GFP (endosomes de recyclage) ou les marqueurs endogènes Rab5 (endosomes précoces), Rab6 (appareil de Golgi) et LAMP1 (lysosomes). (b-c) Images confocales montrant l'internalisation d'anticorps anti-HA réalisée à 4°C ou à 37°C par des cellules T Jurkat surexprimant la molécule chimérique LAT étiquetée à sa partie extracellulaire avec le peptide HA. (b) Localisation relative de l'anticorps anti-HA et LAT (haut) et de l'anticorps anti-HA et Rab11 endogène. (c) Localisation relative de l'anticorps HA-LAT et de phospho-ZAP70. Les résultats représentent 3 expériences (a) et 2 expériences (b,c).

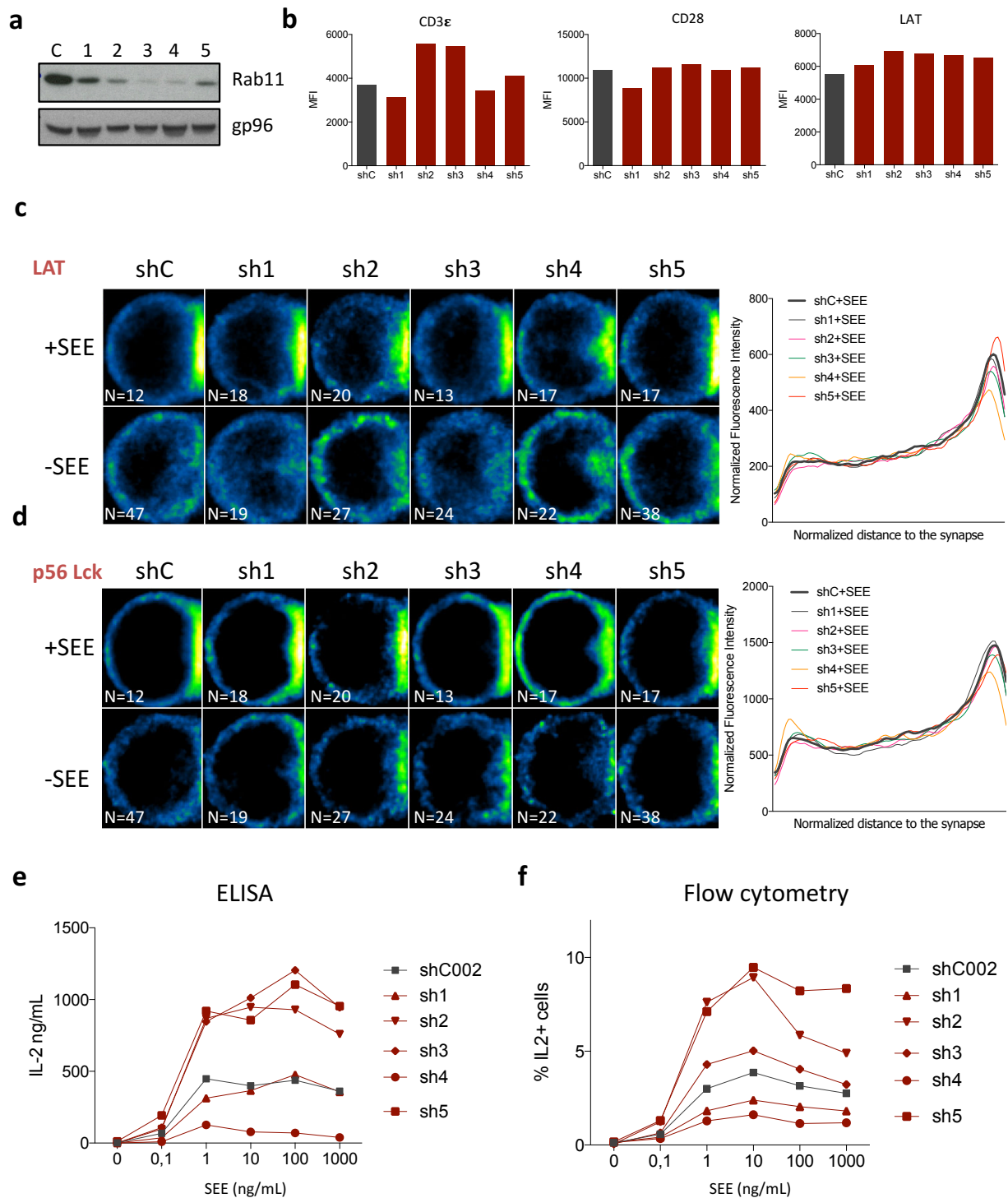


Figure 3.2.2. Le recyclage de LAT à la synapse immunologique n'est pas dépendant de Rab11. (a-d) L'expression de Rab11 a été éteinte dans des cellules Jurkat à l'aide de shRNA spécifiques (sh1, 2, 3, 4, 5) et les effets de ces shRNA ont été comparés à un shRNA contrôle (shC). (a) Immunoblot montrant l'expression de Rab11 et de gp96 (contrôle de charge). (b) Moyennes d'intensité de fluorescence (MFI, moyennes géométriques) analysées en cytométrie de flux pour les marqueurs CD3ε, CD28 et LAT. (c-d) Images confocales représentant des « cellules Jurkat moyennes » activées avec des cellules B Raji +/- SEE (gauche, N, nombre de cellules représentées) et quantification du profil moyen d'intensité de fluorescence des cellules (droite). (c) Analyse du marquage LAT endogène. (d) Analyse du marquage p56^{Lck} endogène. (e-f) La sécrétion/production d'IL-2 ont été mesurées sur des cellules activées pendant 6h avec des cellules B Raji et en présence de différentes concentrations de superantigène SEE. (e) Analyse de la sécrétion d'IL-2 par ELISA. (f) Analyse de la production d'IL-2 par cytométrie en flux. Les résultats représentent une expérience.

HA dans des cellules Jurkat surexprimant une forme chimérique de LAT étiquetée avec le peptide HA à sa partie extracellulaire. A 4°C, seule la fraction de LAT présente à la membrane plasmique était marquée avec l'anticorps anti-HA. (**Fig.3.2.1b**). Cependant, lorsque l'expérience était réalisée à 37°C, la fraction membranaire et la fraction intracellulaire étaient marquées avec l'anticorps anti-HA. De plus, le pool intracellulaire anti-HA colocalisait avec le marqueur Rab11 démontrant que la fraction de LAT présente à la membrane plasmique était internalisée en un pool endocytaire semblant s'accumuler dans un compartiment de recyclage (**Fig.3.2.1b**). Enfin, dans des conjugués formés entre une cellule Jurkat et une cellule Raji pulsée au SEE, le pool internalisé de HA-LAT était recruté à la synapse immune « active », définie par la présence de la forme phosphorylée de ZAP70 (**Fig.3.2.1c**). Ces résultats montrent ainsi que la fraction internalisée de LAT transite par des compartiments endocytiques Rab11⁺ avant d'être recyclée à la synapse immunologique dans les conditions d'activation.

3.2.2. Le recyclage de LAT à la synapse immunologique est indépendant de Rab11

La petite GTPase Rab11 a été décrite dans plusieurs voies de recyclage (Welz et al., 2014). Nous avons donc émis l'hypothèse que le transport de LAT à la synapse immunologique suit une voie de recyclage dépendante de Rab11. Afin de tester cette hypothèse, nous avons exprimé dans des cellules Jurkat des shRNAs ciblant l'ARNm de Rab11 (sh1 à 5), et l'extinction de Rab11 a été analysée par immunoblot (**Fig.3.2.2a**). Le criblage des 5 shRNAs n'a pas mis en évidence de différence majeure pour l'expression de surface des molécules CD3 ϵ et CD28, ou encore pour l'expression totale de LAT (**Fig.3.2.2b**). La comparaison du recrutement de LAT dans des conjugués formés entre des cellules B Raji pulsées avec SEE et des cellules Jurkat exprimant un shRNA contrôle ou l'un des 5 shRNAs spécifiques de Rab11 n'a montré aucune différence consistante de l'enrichissement de LAT à la synapse immunologique (**Fig.3.2.2c**). De plus, les effets inhibiteurs de 2 des shRNAs (sh3 et sh4) sur le recrutement de LAT étaient également observés pour le recrutement de la

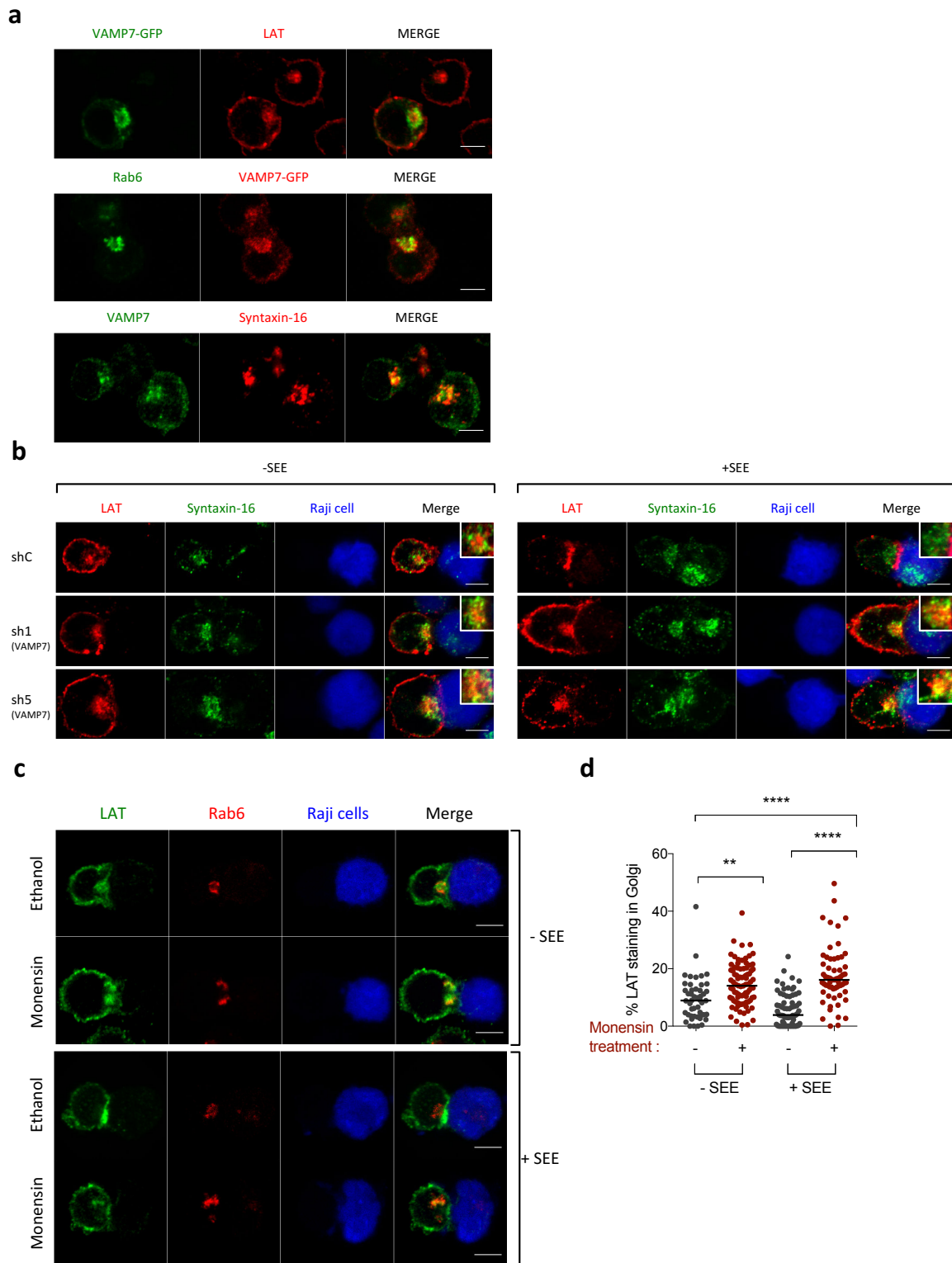


Figure 3.2.3. La fraction intracellulaire de LAT transite dynamiquement par l'appareil de Golgi/TGN. (a) Images confocales montrant les localisations relatives de LAT, VAMP7-GFP, VAMP7, et syntaxin-16, réalisées sur des cellules Jurkat au repos. (b-c) Images confocales montrant des cellules Jurkat conjuguées avec des cellules B Raji +/-SEE. (b) Cellules Jurkat exprimant des shRNA ciblant VAMP7 (sh1 et sh5) ou un shRNA contrôle (shC) et co-marquées pour les formes endogènes de LAT et syntaxin-16. (c) Les cellules Jurkat ont été traitées pendant 45 min avec la monensine ou de l'éthanol (contrôle) et co-marquées pour les formes endogènes de LAT et Rab6. (d) Quantification cellule par cellule du pourcentage du marquage LAT dans les compartiments Rab6 pour chaque condition présentée en (c) (-SEE éthanol, n=48 cellules ; -SEE monensine, n=88 cellules ; +SEE éthanol, n=69 cellules ; +SEE monensine, n=63 cellules). Barres d'échelle : 5µm. ** P<0.01, **** P<0.0001; one-way ANOVA (d, médiane). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences (a,c) et 1 expérience (b) ou récapitulent 3 expériences (d).

kinase p56^{Lck} située en amont de LAT dans la cascade de signalisation par le TCR (**Fig.3.2.2d**). Ces résultats étaient en accord avec des résultats de la littérature montrant que p56^{Lck} emprunte une voie de recyclage dépendante d'effecteurs de Rab11 (Gorska et al., 2009; 2004; Gorska and Alam, 2012). Enfin, lorsque nous avons testé le rôle de Rab11 sur l'activation tardive des cellules (sécrétion et production d'IL-2), comme précédemment, aucun effet consistant n'a été observé (3 shRNA induisant une augmentation de la réponse et 2 shRNA provoquant une diminution) (**Fig.3.2.2e,f**).

Ainsi, nos résultats montrent que la fraction intracellulaire de LAT est contenue dans des compartiments endocytiques provenant de la membrane plasmique et qu'elle recycle à la synapse immunologique. Ils suggèrent que, bien que LAT transite par un compartiment de recyclage Rab11 positif, cette petite GTPase ne soit pas impliquée dans le transport de LAT à la synapse immunologique.

3.2.3. LAT transite par le TGN

Nous avons précédemment montré que le transport de LAT à la synapse immunitaire dépend de la SNARE vésiculaire VAMP7 (**partie 3.1**). Nous avons en effet observé, dans des cellules T Jurkat, dont l'expression de VAMP7 avait été éteinte, un défaut de recrutement de LAT à la synapse immunologique (**Fig.3.1.1,3**). Nous avons ainsi cherché à comprendre les localisations relatives de VAMP7 et LAT par microscopie confocale dans des cellules Jurkat contrôles ou n'exprimant pas VAMP7. Dans les cellules contrôles au repos, le marquage LAT est juxtaposé à celui des compartiments VAMP7, plus périphériques (**Fig.3.2.3a**). Comme dans d'autres types cellulaires (Burgo et al., 2012), VAMP7 était présente dans l'appareil de Golgi/TGN des cellules Jurkat, défini par la petite GTPase Rab6 et la t-SNARE syntaxin-16 (**Fig.3.2.3a**). Ainsi, bien que VAMP7 soit impliquée dans le trafic de LAT à la synapse immune, la fraction intracellulaire de LAT ne colocalise que très peu avec VAMP7 ou d'autres marqueurs spécifiques de l'appareil de Golgi (Rab6, **Fig.3.2.1a** et syntaxine-16, **Fig.3.2.3b**) dans des cellules quiescentes. Cependant, dans les cellules Jurkat

n'exprimant pas VAMP7, le pool interne de LAT était retenu dans un compartiment syntaxine-16⁺ suggérant que le LAT transite par l'appareil de Golgi/TGN.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé le transport de LAT dans les cellules Jurkat traitées pendant 45 minutes avec de la monensine, un inhibiteur bloquant la sortie de cargos depuis l'appareil de Golgi. Au repos, les cellules contrôles traitées avec de l'éthanol (le diluant de la monensine) ont montré que la fraction intracellulaire de LAT était entourée par l'appareil de Golgi repéré à l'aide de la petite GTPase Rab6 (**Fig.3.2.3c**, et quantifié en **Fig.3.2.3d**) corroborant les résultats obtenus précédemment (**Fig.3.2.1a** et **Fig.3.2.3a,b**). Dans les conditions d'activation, LAT était recrutée à la synapse formée entre les cellules Jurkat et les cellules B Raji pulsées au SEE, laissant le compartiment Rab6 à l'arrière de la synapse. Les cellules Jurkat traitées avec la monensine présentaient une redistribution du pool intracellulaire de LAT au Golgi à la fois dans les cellules au repos et dans les cellules activées (**Fig.3.2.3c**, et quantifié en **Fig.3.2.3d**). Cette redistribution était accompagnée d'un défaut de recrutement de LAT à la synapse immune.

Ces résultats indiquent que la fraction intracellulaire de LAT transite de manière dynamique par le Golgi/TGN.

3.2.4. Rab6 contrôle le recrutement de LAT à la synapse immunologique

Les résultats présentés jusqu'ici suggèrent que le LAT endocytaire transite *via* l'appareil de Golgi avant d'être redistribué à la zone synaptique. Rab6 est une petite GTPase golgienne qui contrôle plusieurs étapes de transport et notamment le transport rétrograde entre les endosomes de recyclage et le Golgi/TGN ainsi que le transport antérograde entre le Golgi et la périphérie cellulaire (Mallard et al., 2002). Nous avons ainsi analysé le rôle de la petite GTPase Rab6 dans le transport de LAT. L'expression de Rab6 a été inhibée par expression de shRNAs spécifiques de Rab6a/a' (sh6 et sh7). Le niveau de déplétion de la protéine Rab6 dans les cellules exprimant ces deux shRNA était de plus de 95% (**Fig.3.2.4a**). Le transport de LAT à la synapse immunologique a été analysé par microscopie TIRF (TIRFM) sur cellules

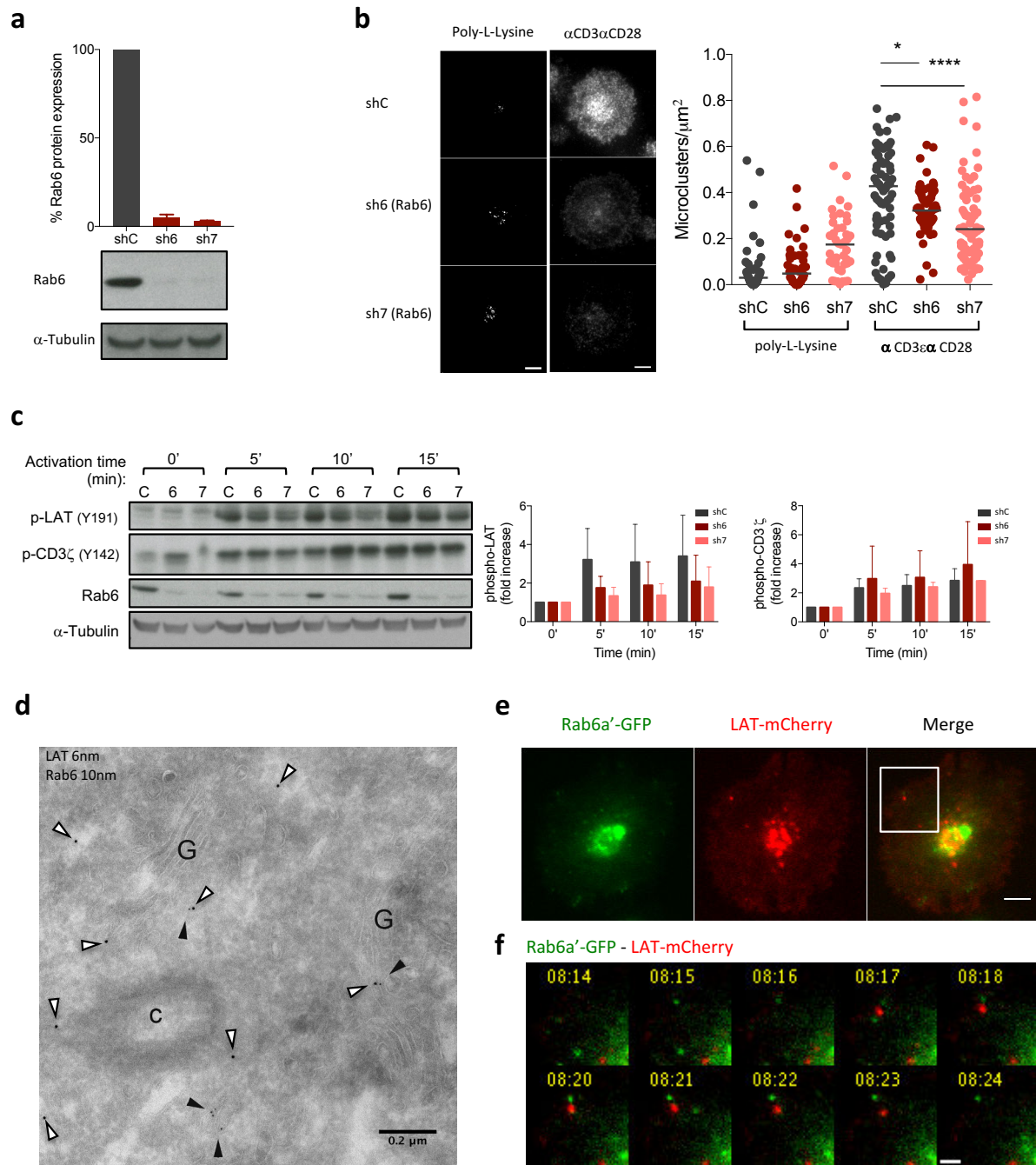


Figure 3.2.4. Rab6 est impliquée dans le transport de LAT à la synapse immunologique. (a-c) Cellules T Jurkat exprimant un shRNA contrôle (shC) ou des shRNA spécifiques de l'ARNm de Rab6 (sh6 et sh7). (a) Immunoblot montrant les protéines Rab6 et tubuline- α (bas) et quantification de l'expression de Rab6 normalisée par l'expression de la tubuline- α et par l'expression du shC (haut). (b) Images TIRF de cellules Jurkat incubées 10 min sur lamelles recouvertes de poly-L-Lysine (condition non activée) ou de poly-L-lysine et d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 (condition activatrice) avant fixation et marquage du LAT endogène (gauche), quantification du recrutement de LAT dans le champ d'évanescence TIRF, exprimé en microclusters/ μm^2 (droite). (c) Immunoblot montrant phospho-LAT et phospho-CD3 ζ dans des cellules Jurkat activées pendant différents temps avec des cellule B Raji en présence de SEE (gauche). Quantification des intensités de phospho-LAT et phospho-CD3 ζ normalisées par les intensités du signal de la tubuline- α (contrôle de charge) et des signaux des cellules Jurkat non activées et exprimant les shRNA respectifs (droite). (d) Images de microscopie électronique à transmission montrant une cellule Jurkat surexprimant LAT et immunomarkée pour LAT (6nm, flèches pleines) et Rab6 (10nm, flèches vides) ; C, centriole ; G, appareil de Golgi. Image de vidéomicroscopie TIRF montrant le recrutement de LAT et Rab6 à la synapse immune. Des cellules Jurkat co-exprimant Rab6a'-GFP et LAT-mCherry ont été déposés sur un substrat recouvert d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 et le recrutement dynamique des molécules chimérique a été suivi. Carré blanc, région agrandie et présentée en (f). (f) « Time-lapse » montrant des vésicules LAT-mCherry et Rab6a'-GFP présentées en (e). Barres d'échelle, 5 μm (b,e) et 2 μm (f). ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; one-way ANOVA (b). Les résultats récapitulent 4 expériences (a ; moyenne et s.d.), 3 expériences (b ; médiane), 2 expériences (c ; moyenne et s.e.m) ou sont représentatifs de 2 expériences (e,f) et 1 expérience (d).

Jurkat déposées sur lamelles recouvertes d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 ou bien sur substrat neutre (poly-L-Lysine). Comme observé précédemment, l'activation par CD3 et CD28 induisait une augmentation de la densité de microclusters LAT présents dans le champ d'évanescence du microscope TIRF (**Fig.3.2.4b**). Dans les cellules n'exprimant pas Rab6, le recrutement de LAT à la synapse immune était diminué (**Fig.3.2.4b**). Ces résultats n'étaient pas liés à des défauts d'expression de CD3 ϵ , CD28 ou LAT (**Fig.3.2.5**). Le recrutement de LAT induit par le TCR précède et est essentiel pour la phosphorylation de LAT (W. Zhang et al., 1998). Nous avons donc examiné la phosphorylation de LAT par immunoblot dans les cellules Jurkat activées avec des cellules B Raji en présence de SEE. L'extinction de Rab6 était accompagnée d'une diminution de la phosphorylation de LAT (**Fig.3.2.4c**). En revanche, l'état de phosphorylation de la chaîne CD3 ζ n'était pas altéré par l'extinction de Rab6 suggérant que les effets observés sur la phosphorylation de LAT n'étaient pas liés à des défauts précoces de la cascade de signalisation induite par le TCR/CD3.

Afin de mieux caractériser le compartiment contenant Rab6 et LAT, nous avons utilisé la microscopie électronique dans des cellules Jurkat. Nous avons noté que LAT était présente dans des compartiments distribués à proximité du centrosome et dans des saccules de l'appareil de Golgi (**Fig.3.2.4d**). Certains de ces compartiments étaient co-marqués avec Rab6, confirmant que LAT transite par des compartiments Rab6⁺. Nous avons ensuite observé de manière dynamique le recrutement de LAT et Rab6 à la synapse immune par videoTIRF dans des cellules Jurkat co-exprimant les molécules chimériques LAT-mCherry et Rab6a'-GFP et étalées sur une surface activatrice (anti-CD3 ϵ /anti-CD28). LAT était polarisée au centre de la synapse et semblait interagir étroitement avec les compartiments Rab6a'-GFP (**Fig.3.2.4e** et **Vidéo 3.2**). Nous avons pu noter l'apparition de microclusters LAT, se déplaçant vers la périphérie et retournant ensuite vers le centre de la synapse. Cependant, une fois les vésicules LAT à la périphérie, aucune d'elles n'était décorée par Rab6 (**Fig.3.2.4e**), suggérant que contrairement à VAMP7 (**Fig.3.1.5** et **Vidéo 3.1**), Rab6 n'accompagne pas LAT du compartiment intracellulaire à la périphérie.

Pour visionner la vidéo, rendez-vous à cette adresse :

https://www.dropbox.com/s/cgp5phzsfzy7tl/Video_Supplementaire_3_2.avi?dl=0

Video 3.2. Trafic de LAT et Rab6 à la synapse immunologique. « Time-lapse » réalisé par microscopie TIRF sur des cellules Jurkat vivantes exprimant LAT-mCherry et Rab6a'-GFP étalées sur un substrat recouvert d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28.

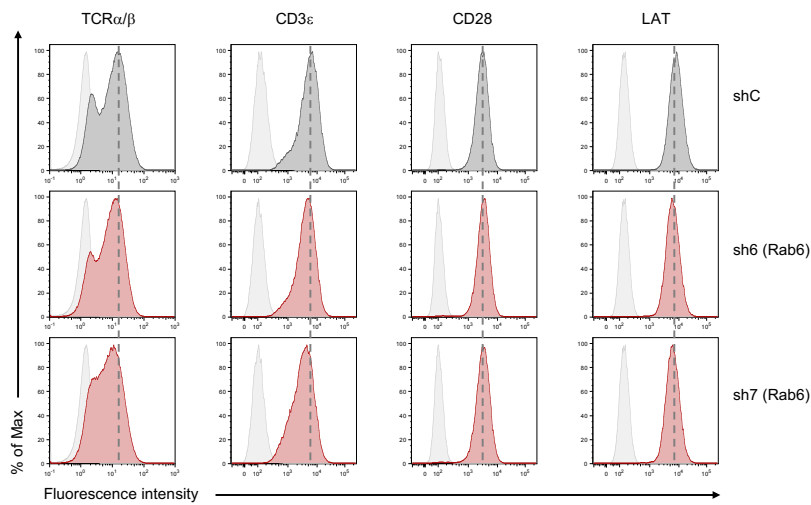


Figure 3.2.5. Expression de marqueurs de surface et de LAT dans les cellules éteintes pour Rab6. Analyse en cytométrie de flux de l'expression de surface du TCR α/β , CD3 ϵ et CD28 et expression totale de LAT dans des cellules Jurkat exprimant le shRNA contrôle (shC) et les shRNA spécifiques de Rab6 (sh6 et sh7) ; les courbes gris clair montrent les contrôles isotypiques. Les données sont représentatives de plus de 3 expériences.

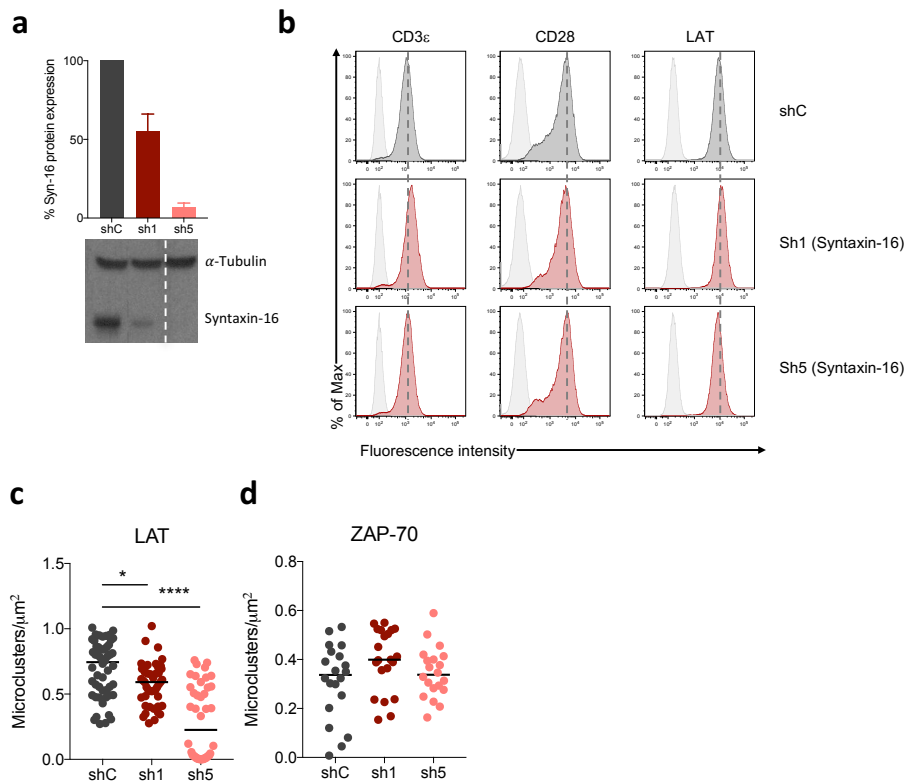


Figure 3.2.6. La syntaxine-16 contrôle le recrutement de LAT à la synapse immunologique. (a-d) Cellules T Jurkat exprimant un shRNA contrôle (shC) ou des shRNA ciblant l'ARNm de la syntaxine-16 (sh1 et sh5). (a) Immunoblot montrant les protéines syntaxin-16 et tubuline- α (bas) et quantification de l'expression de la syntaxin-16 normalisée par l'expression de la tubuline- α et par l'expression du shC (haut). (b) Analyse en cytométrie de flux de l'expression de surface de CD3 ϵ et CD28 et expression totale de LAT; les courbes gris clair montrent les contrôles isotypiques. (c-d) Quantification du recrutement de LAT (c) et ZAP70 (d) à la synapse de cellules Jurkat étalées sur des lamelles recouvertes d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28, et acquises en microscopie TIRF, exprimé en microclusters/ μm^2 . *P<0.05, **** P<0.0001; one-way ANOVA (c). Les données récapitulent 2 expériences (a,c) et 1 expérience (d) ou sont représentatives de 2 expériences (b).

Ces données montrent ainsi que LAT est présente dans des compartiments intracellulaires Rab6⁺ et que Rab6 contrôle le recrutement des vésicules LAT à la synapse immunologique.

3.2.5. LAT emprunte une voie de transport rétrograde depuis les endosomes vers le TGN

Rab6 régule le transport rétrograde de plusieurs cargos entre les endosomes et le Golgi/TGN mais aussi le transport antérograde entre le Golgi/TGN et la membrane plasmique (Grigoriev et al., 2011a; 2007; Mallard et al., 2002; Miserey-Lenkei et al., 2010). Nous avons montré que Rab6 contrôle le trafic de LAT à la synapse immunologique mais cette petite GTPase n'est cependant pas présente au niveau des vésicules LAT transportées depuis le centre de la synapse vers la périphérie (**Fig.3.2.4f**). Nous avons donc émis l'hypothèse que Rab6 régule le transport rétrograde de LAT plutôt que son transport antérograde à la synapse. Afin de tester cette hypothèse de travail, nous avons éteint l'expression de la t-SNARE syntaxine-16 (**Fig.3.2.6a**), qui est un partenaire canonique du transport rétrograde depuis les endosomes vers le TGN et médié par Rab6 (Amessou et al., 2007; Mallard et al., 2002). L'expression de 2 shRNAs (sh1 et sh5) ciblant l'ARNm de la syntaxine-16 par les cellules T Jurkat n'altérait ni l'expression de CD3 ϵ et CD28 à la surface des cellules, ni l'expression totale de LAT (**Fig.3.2.6b**). De plus, le recrutement de LAT à la synapse immunologique était déficient dans les cellules exprimant les shRNAs spécifiques de la syntaxine-16, avec un effet dose-réponse : plus l'expression de la syntaxine-16 était éteinte, plus le recrutement de LAT était inhibé (**Fig.3.2.6c**). En revanche, la kinase ZAP70 était normalement recrutée à la synapse attestant que le défaut observé ne découlait pas d'une signalisation déficiente en amont de LAT (**Fig.3.2.6d**).

Ces résultats indiquent que LAT trafique entre les endosomes et le Golgi/TGN par une voie rétrograde, dépendante de Rab6 et de la syntaxin-16.

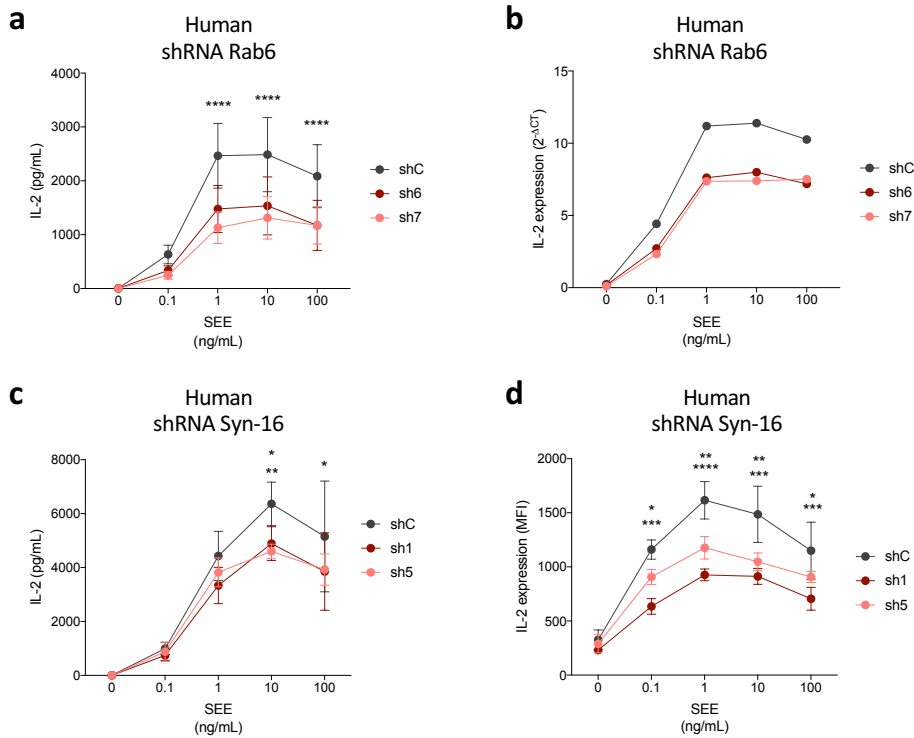


Figure 3.2.7. La voie de transport rétrograde régulée par Rab6 et syntaxin-16 est requise pour la production d'IL-2 par les lymphocytes T. (a-d) La sécrétion/production d'IL-2 ont été mesurées dans des cellules T Jurkat activées pendant 6h avec des cellules B Raji en présence de différentes concentrations de superantigène SEE. (a-b) Les cellules Jurkat expriment un shRNA contrôle (shC) ou des shRNA spécifiques de Rab6, sh6 et sh7. (c-d) Les cellules Jurkat expriment un shRNA contrôle (shC) ou des shRNA ciblant la syntaxin-16, sh1 et sh5. (a-c) Sécrétion d'IL-2 dans le surnageant de culture et mesurée par ELISA. (b-d) Production d'IL-2 dans les cellules T Jurkat mesurée par PCR quantitative (b) ou mesurée par cytométrie en flux intracellulaire (d). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; one-way ANOVA (a-d). Les résultats sont la compilation de 5 expériences (a ; moyenne, s.e.m.), 2 expériences (c, d ; moyenne, s.e.m.), une expérience (b).

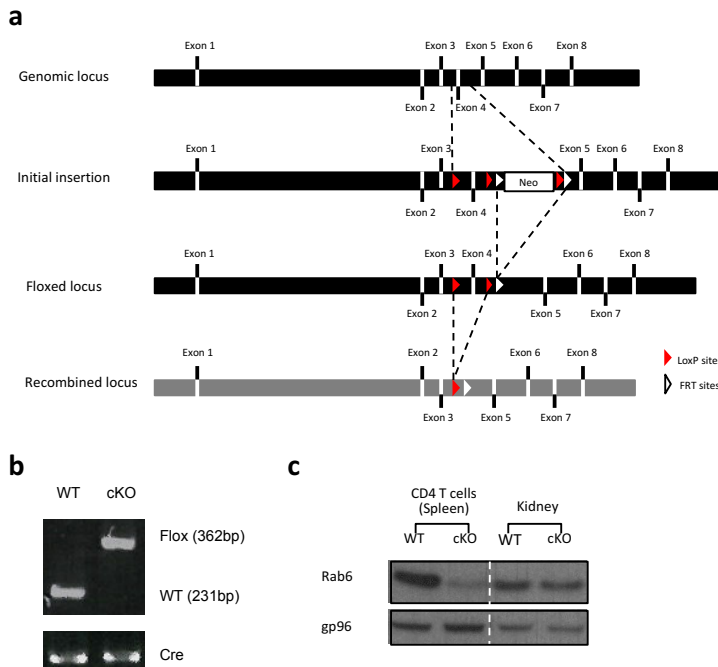


Figure 3.2.8. Génération des souris Rab6 cKO. (a) Stratégie de génération des souris Rab6^{flox/flox}. L'exon 4 du gène Rab6 a été flanqué de sites LoxP. Après délétion de la cassette néomycine nécessaire à la sélection des cellules ayant subi l'insertion de la construction, le locus floxé est obtenu et recombinaison dans les cellules exprimant la recombinase Cre (Rab6 cKO). (b) Etat floxé ou sauvage (WT) du locus Rab6. (b) Analyse par PCR de la présence (Flox) ou absence (WT) d'un site LoxP à l'abord de l'exon 4 du gène Rab6. (c) Immunoblot montrant l'expression de Rab6 et gp96 (contrôle de charge) dans des lymphocytes T CD4⁺ de rate (gauche) ou dans les cellules totales

3.2.6. La machinerie de transport rétrograde contrôle la réponse lymphocytaire T

Afin de mieux caractériser le rôle de la machinerie de transport rétrograde dans la réponse lymphocytaire T, les effets de l'extinction de Rab6 et de la syntaxine-16 sur l'activation tardive des lymphocytes T ont été mesurés. Après activation par des cellules Raji et différentes concentrations de superantigène SEE, l'IL-2 sécrétée dans les surnageants de culture a été mesurée par ELISA. Les défauts d'expression de Rab6 et de la syntaxine-16 étaient accompagnés d'une diminution de la concentration d'IL-2 dans ces surnageants (**Fig.3.2.7a,c**). Afin de différencier le défaut de sécrétion d'un défaut de production, nous avons mesuré dans les cellules éteintes pour Rab6 l'ARNm de l'IL-2 par PCR quantitative et dans les cellules éteintes pour la syntaxine-16 la présence d'IL-2 intracellulaire par cytométrie en flux (**Fig.3.2.7b,d**). La production d'IL-2 était dans les deux cas significativement diminuée.

Bien que n'excluant pas une implication dans la sécrétion d'IL-2, ces résultats indiquent que les acteurs testés de la machinerie de transport rétrograde, Rab6 et syntaxine-16, contrôlent la production d'IL-2 ce qui est cohérent avec les défauts de recrutement et de phosphorylation de LAT que nous avons mis en évidence.

3.2.7. Le recrutement de LAT et l'activation lymphocytaire T sont déficients chez la souris en absence de Rab6

Afin de confirmer nos résultats dans des cellules primaires, nous avons utilisé des souris décrites par l'équipe de Bruno Goud (Bardin et al., 2015) dans lesquelles l'exon 4 de *RAB6A/A'* a été flanqué par des sites LoxP (**Fig.3.2.8a**). Ces souris ont été croisées avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le promoteur de CD4 ($Rab6^{flox/flox}$ CD4-Cre⁺ qui sera nommé Rab6 cKO) (**Fig.3.2.8b**). Comme attendu, la protéine Rab6 était absente des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ (non montré). L'absence de Rab6 dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ était spécifique

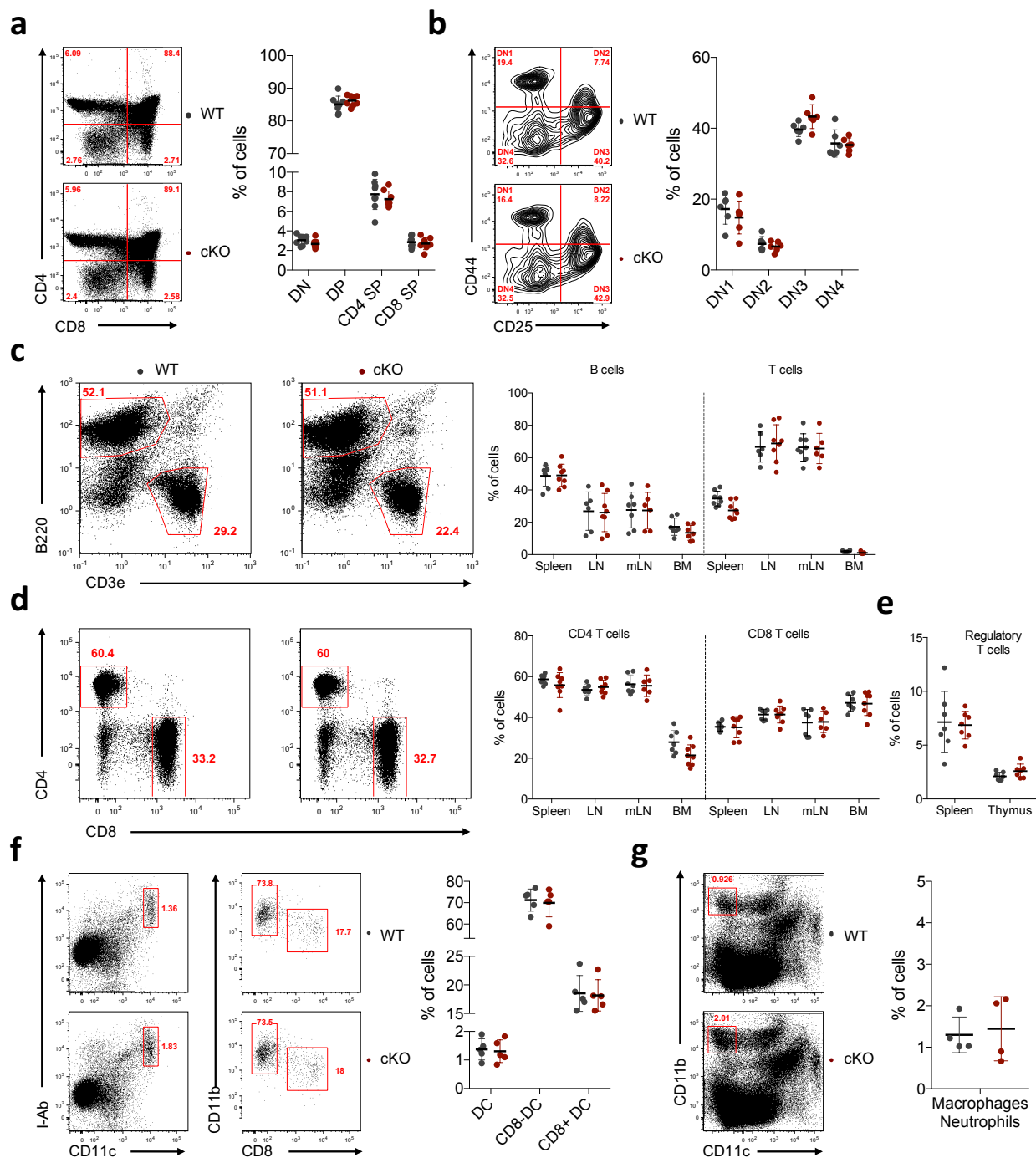


Figure 3.2.9. Caractérisation des compartiments immunitaires des souris Rab6 cKO. (a-g) Analyse en cytométrie de flux des populations immunitaires dans les souris Rab6 cKO (rouge) et les souris WT (gris). Chaque symbole représente une souris. (a) Stades de développement thymique DN, DP, CD4SP et CD8SP (gauche) et pourcentages obtenus pour différentes souris (droite). (b) Stades DN de développement thymique (gauche) et pourcentages pour différentes souris (droite). (c) Populations de lymphocytes B (B220⁺) et T (CD3ε⁺) dans la rate (gauche) et pourcentages de chacune des populations dans la rate (spleen), les ganglions lymphatiques (LN), les ganglions lymphatiques mésentériques (mLN) et la moelle osseuse (BM) de différentes souris (droite). (d) Populations de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ dans la rate (gauche) et pourcentages de ces populations dans la rate, les ganglions lymphatiques (LN), les ganglions lymphatiques mésentériques (mLN) et la moelle osseuse (BM) de différentes souris (droite). (e) Pourcentages de lymphocytes T régulateurs (FoxP3⁺CD25⁺) dans la rate et le thymus et analysés dans la population splénique TCRβ⁺CD4⁺ et dans la population thymique CD4SP. (f) Populations spléniques de cellules dendritiques (DC, I-Ab⁺CD11c⁺) et des sous-populations de DCs (DC CD11b⁺, DC CD8⁺) (gauche), et pourcentages de chacune des populations (droite). (g) Population de macrophages et granulocytes neutrophiles (CD11b⁺CD11c⁻) (gauche) et quantification dans différentes souris (droite). Les données sont la compilation de 6 souris (a,b ; s.d.), 7 souris (c-d, s.d.), 5 souris (e ; s.d.) ou 4 souris (f,g ; s.d.).

puisque aucune déplétion n'était constatée dans d'autres tissus (**Fig.3.2.8c**). Dans ces souris, aucune perturbation majeure du développement thymique n'était observée, en termes de cellularité ou de pourcentage des populations double négative (DN), double positive (DP) et simple positive (SP) CD4 et CD8 (**Fig.3.2.9a**). Les quatre stades de différenciation des thymocytes DN (DN1, CD44⁺CD25⁻ ; DN2, CD44⁺CD25⁺ ; DN3, CD44⁻CD25⁺ ; DN4, CD44⁻CD25⁻) étaient également normalement représentés dans les souris Rab6 cKO (**Fig.3.2.9b**). En périphérie, les pourcentages de lymphocytes T (**Fig.3.2.9c**), de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (**Fig.3.2.9d**) et de lymphocytes T régulateurs (**Fig.3.2.9e**) n'étaient pas altérés. Enfin, aucune différence majeure n'était notée pour les pourcentages de lymphocytes B (**Fig.3.2.9c**), de cellules dendritiques CD8⁺ et CD11b⁺ (**Fig.3.2.9f**), de granulocytes neutrophiles et macrophages (**Fig.3.2.9g**) entre les souris Rab6 cKO et les souris contrôles (WT).

Comme dans les Jurkat exprimant des shRNAs spécifiques de Rab6, le recrutement de LAT à la synapse immune formée entre des lymphocytes T CD4⁺ et un substrat recouvert d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 était diminué dans les lymphocytes T issus de souris Rab6 cKO (**Fig.3.2.10a**). Par ailleurs, les niveaux d'expression de CD3 ϵ et CD28 à la surface cellulaire et de l'expression totale de LAT dans les lymphocytes T CD4⁺ Rab6 cKO n'étaient pas altérés (**Fig.3.2.10b**).

Le rôle de Rab6 dans la réponse lymphocytaire T a d'abord été testé par activation des lymphocytes T CD4⁺ purifiés avec les anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28. Aucun défaut d'expression du marqueur précoce d'activation CD69 à 20h, ni de défaut de prolifération à 72h n'a été observé (**Fig.3.2.11a**). Au contraire, une légère augmentation de la réponse, reproductible d'une expérience à l'autre, a été mise en évidence. Une observation similaire a été obtenue avec les LT CD4⁺ VAMP7 KO activés en présence d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 et pour lesquelles la réponse IFN- γ (**Fig.3.2.11b**) et la prolifération (non montré) était augmentée après 72h par rapport aux LT contrôles. Ce résultat nous est apparu surprenant dans la mesure où, dans un système de présentation antigénique OT-II, un défaut global de la réponse des LT CD4⁺ VAMP7 KO avait été observé (**Fig.3.1.9c-e**).

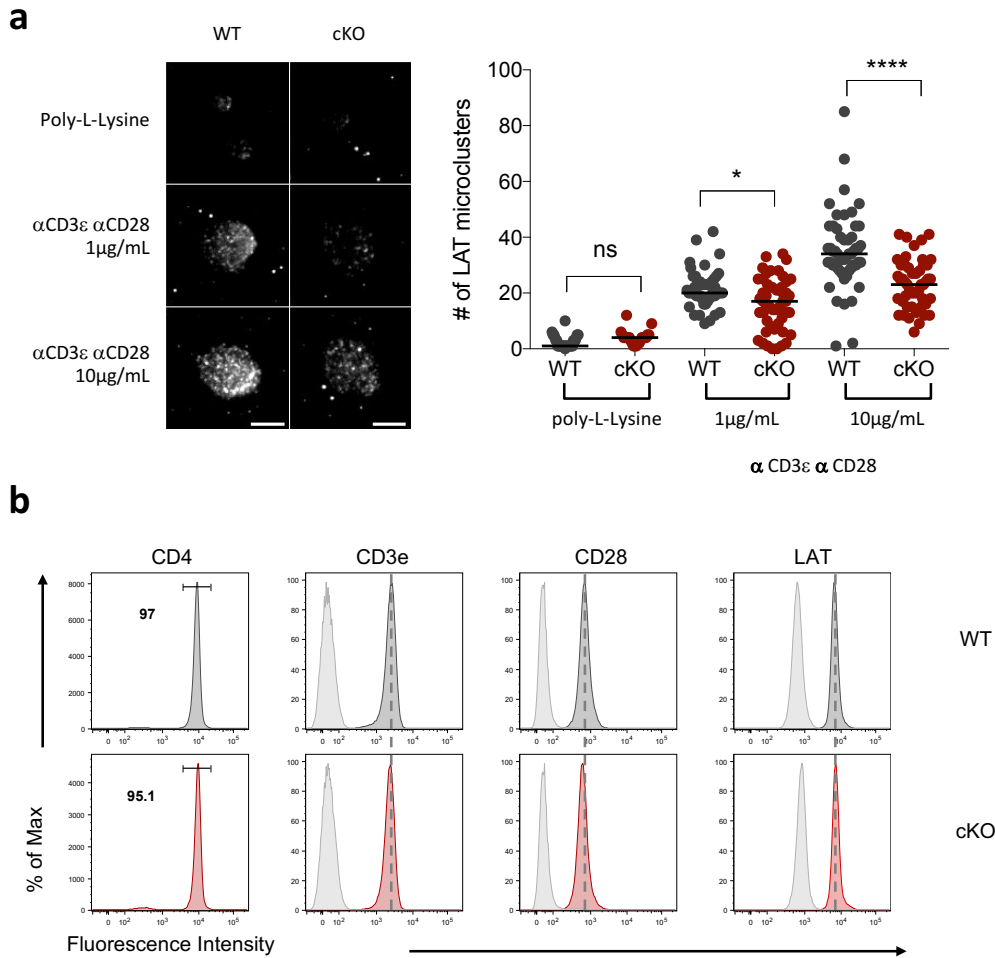


Figure 3.2.10. Le recrutement de LAT à la synapse immunitaire est déficient dans les lymphocytes T CD4⁺ Rab6 cKO. (a) Quantification par microscopie TIRF du nombre de microclusters LAT recrutés à la synapse immunologique dans des lymphocytes T CD4⁺ incubés sur poly-L-lysine seule ou anti-CD3 ϵ /anti-CD28 (1 ou 10 μ g/mL) (WT poly-L-Lysine, n=30 cellules; cKO poly-L-Lysine n=23; WT 1 μ g/mL α CD3 ϵ / α CD28 n=49; cKO 1 μ g/mL α CD3 ϵ / α CD28 n=49; WT 10 μ g/mL α CD3 ϵ / α CD28 n=54; cKO 10 μ g/mL α CD3 ϵ / α CD28 n=61). (b) Analyse par cytométrie de flux de l'expression en surface des marqueurs CD4, CD3 ϵ , CD28 et de l'expression totale de LAT. * P<0.05, **** P<0.0001; one-way ANOVA (a). Les résultats récapitulent 2 expériences (a ; médiane) et sont représentatifs de plus de 3 expériences (b).

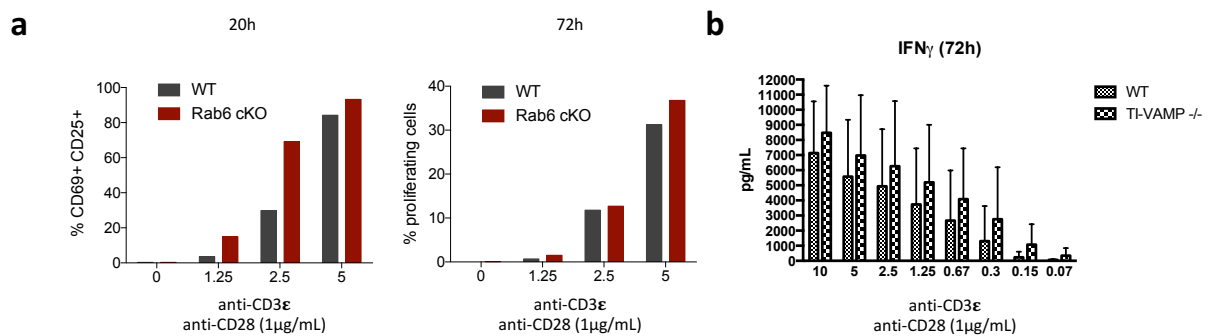


Figure 3.2.11. L'activation tardive des lymphocytes T CD4⁺ de souris n'est pas impactée en absence de Rab6 dans un système antigène non spécifique. (a-b) Analyse par cytométrie en flux de l'activation de lymphocytes T CD4⁺ cultivés en présence d'anticorps anti-CD3 ϵ (fixé, différentes doses) et anti-CD28 (soluble, 1 μ g/mL). (a) Analyse dans les lymphocytes T CD4⁺ WT ou Rab6 cKO marqués avec un colorant de prolifération (CTV) de l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25 à 20h et du pourcentage de cellules ayant proliféré à 72h. (b) Analyse de la sécrétion d'IFN γ par des lymphocytes T CD4⁺ WT ou VAMP7 KO à 72h. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences (a,b).

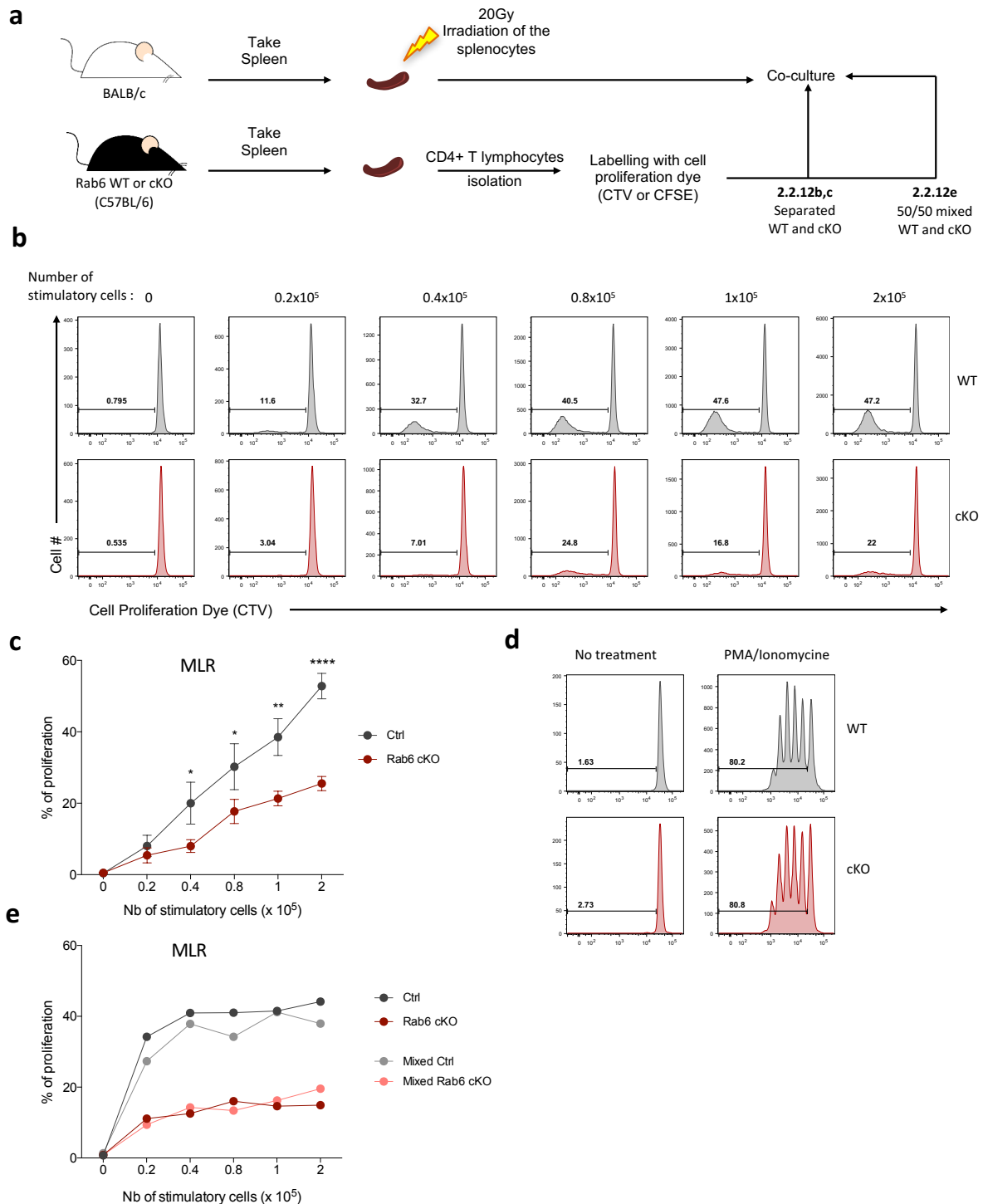


Figure 3.2.12. L'activation tardive des lymphocytes T CD4⁺ de souris est déficiente en absence de Rab6 dans un contexte allogénique. (a) Schéma expérimental. (b-e) Analyse par cytométrie en flux de la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ contrôles ou Rab6 cKO, marqués avec un colorant permettant de détecter les cellules proliférantes (CTV). (b-c) Les lymphocytes T CD4⁺ sont stimulés pendant 5 jours avec différents nombres de splénocytes allogéniques (BALB/c) irradiés (MLR). (b) Expérience représentative. (c) Pourcentages de prolifération récapitulant 5 souris par groupe. (d) Stimulation des cellules T pendant 5 jours avec de faibles concentrations de PMA/ionomycine (7,5x10⁻⁷M et 2x10⁻⁸M). (e) Les lymphocytes T CD4⁺ Rab6 cKO ont été marqués avec le colorant de prolifération CFSE, incubés seuls (couleurs foncées) ou en présence (ratio 1 :1) de lymphocytes T CD4⁺ contrôles (Ctrl) marqués avec le colorant de prolifération CTV (couleurs claires), et stimulés avec différents nombres de splénocytes irradiés de souris BALB/c. Analyse des pourcentages de cellules en prolifération. * P<0.05, ** P<0.01, **** P<0.0001; two-way ANOVA (c). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences (d), 4 expériences (b) 2 expériences (e) ou récapitulent 4 expériences (c; moyenne, s.e.m.).

Nous avons ainsi cherché à nous placer des conditions plus physiologiques de présentation antigénique. Pour cela, les cellules T Rab6 cKO polyclonale ont été activées dans le contexte d'une réaction lymphocytaire mixte (MLR) (**Fig.3.2.12a**). Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ ont été marqués avec un colorant dont la dilution à chaque division cellulaire permet de suivre la prolifération cellulaire par cytométrie de flux. Après cinq jours de co-culture avec des splénocytes allogéniques (BALB/c, cellules stimulatrices), la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ n'exprimant pas Rab6 était très diminuée par rapport aux lymphocytes T contrôles (**Fig.3.2.12b,c**). En revanche, la prolifération des cellules cKO n'était pas altérée en présence de PMA/ionomycine (**Fig.3.2.12d**), montrant que la division cellulaire en elle-même n'était pas perturbée en absence de Rab6 et appuyant les résultats obtenus avec des anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 (**Fig.3.2.11a**). Enfin, les défauts mise en évidence par MLR dans les cellules Rab6 cKO étaient également observés lorsque la MLR était réalisée en présence de lymphocytes T WT (**Fig.3.2.12e**). Cela indique que les défauts observés étaient intrinsèques aux lymphocytes T Rab6 cKO et non liés à des facteurs sécrétés.

Ainsi, dans les lymphocytes T de souris, Rab6 contrôle le recrutement de LAT à la synapse immune et l'activation des lymphocytes T CD4⁺.

3.2.8. La réponse lymphocytaire T est abrogée en absence de Rab6

Enfin, nous avons documenté le rôle de Rab6 dans la réponse lymphocytaire T *in vivo*. Pour cela, nous avons analysé l'état d'activation des lymphocytes dans le contexte sanitaire de notre animalerie. En comparaison au contrôle de portée, la rate, la moelle osseuse et le sang des souris Rab6 cKO présentaient en proportion une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD62L⁺ CD44⁻) (**Fig.3.2.13a,b**). En revanche, la proportion de cellules effectrices/mémoires (CD62L⁻ CD44⁺) était diminuée. Ces résultats pouvaient signifier un défaut de génération et/ou de maintenance du compartiment des lymphocytes T mémoires. Afin de déterminer si la génération d'une réponse lymphocytaire T était déficiente *in vivo* en absence de Rab6,

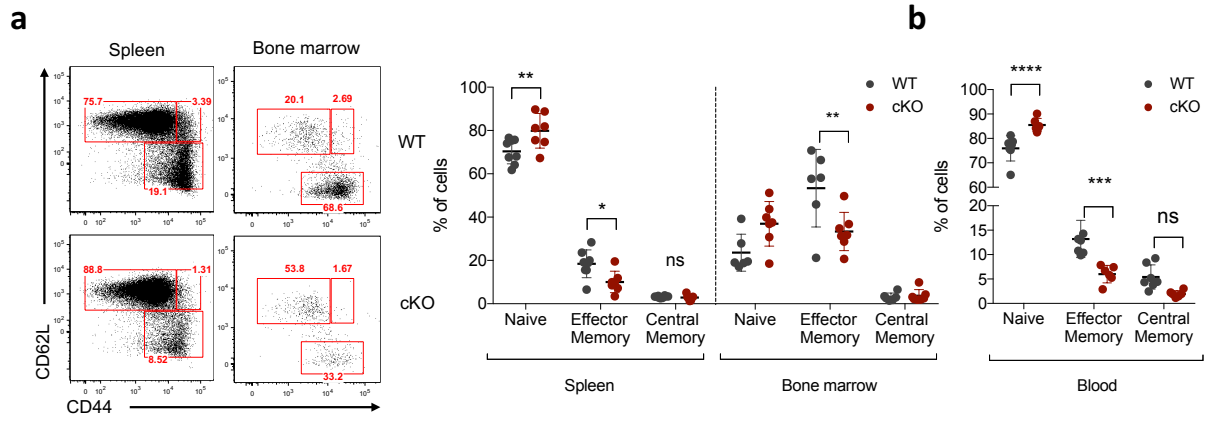


Figure 3.2.13. Le compartiment effecteur/mémoire est réduit en absence de Rab6 (a) Analyse représentative par cytométrie en flux des cellules T CD4⁺ naïves (CD62L⁺ CD44⁻), effectrices/mémoires (CD62L⁻ CD44⁺) et centrales/mémoires (CD62L⁻ CD44⁻) issues de la rate ou de la moelle osseuse de souris WT ou Rab6 cKO (gauche) et quantification des pourcentages de chaque population (droite). (b) Pourcentages de cellules T CD4⁺ naïves, effectrices/mémoires et centrales/mémoires dans le sang de souris WT ou Rab6 cKO. Chaque symbole représente 1 souris. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001; two-way ANOVA (a,b). Les résultats récapitulent 7 à 8 souris par groupe (a,b ; moyenne et s.d.).

nous avons immunisé les souris avec un antigène spécifique dans un contexte lymphocytaire polyclonal. Plusieurs cohortes de chimères hématopoïétiques ont été générées en reconstituant des souris Rag2 KO (dépourvues de lymphocytes) qui ont été irradiées et reconstituées avec des cellules de moelles osseuses issues de souris WT ou Rab6 cKO (schéma expérimental en **Fig.3.2.14a**). Après 8 à 10 semaines de reconstitution, les compartiments de lymphocytes B et T, mesurés dans le sang, étaient comparables pour les deux groupes de souris. (**Fig.3.2.14b**). Ces chimères ont alors été immunisées en injectant, en sous-cutané, la protéine ovalbumine (OVA) seule ou émulsifiée avec l'adjuvant complet de Freund (CFA). Onze jours après l'immunisation, les cellules issues de la rate et le ganglion lymphatique drainant de chaque souris ont été restimulées *ex vivo* pendant 24h ou 48h selon les cytokines analysées, avec un antigène irrelevant (albumine de sérum humain, HSA), l'antigène ayant servi à l'immunisation (ovalbumine), ou des peptides issus de l'ovalbumine, à savoir le peptide de classe-I (OVA₂₅₇₋₂₆₄) testant la réponse T CD8 ou le peptide de classe-II (OVA₃₂₃₋₃₃₉) mettant en évidence la réponse T CD4. La réponse lymphocytaire T a été analysée par ELISPOT pour mesurer la sécrétion de différentes cytokines. Comme attendu, les souris WT ont répondu de manière robuste à l'immunisation CFA/OVA en comparaison avec les souris injectées avec l'ovalbumine seule (**Fig.3.2.14c-e** et **Fig.3.2.15**). Cette réponse était antigène spécifique, la restimulation avec l'antigène irrelevant n'induisant aucune ou qu'une très faible réponse cytokinique (IFN- γ , IL-17A, IL-2, IL-4) (**Fig.3.2.14c-e** et **Fig.3.2.15a-c**). En revanche la réponse lymphocytaire T des souris cKO à l'ovalbumine était fortement affectée, avec une diminution des réponses IFN- γ (**Fig.3.2.14c,d**), IL-17A (**Fig.3.2.14c,e**), IL-2, IL-4 et IL-5 (**Fig.3.2.15a-c**). Enfin, la restimulation *ex vivo* en PMA/ionomycine a induit une réponse similaire des splénocytes WT et Rab6 cKO indiquant que les défauts observés en absence de Rab6 ne sont pas dus à un défaut dans la sécrétion des cytokines testées.

Ces résultats démontrent le rôle important *in vivo* de Rab6 dans la réponse lymphocytaire T à une stimulation antigénique confirmant le défaut observé dans le modèle de MLR.

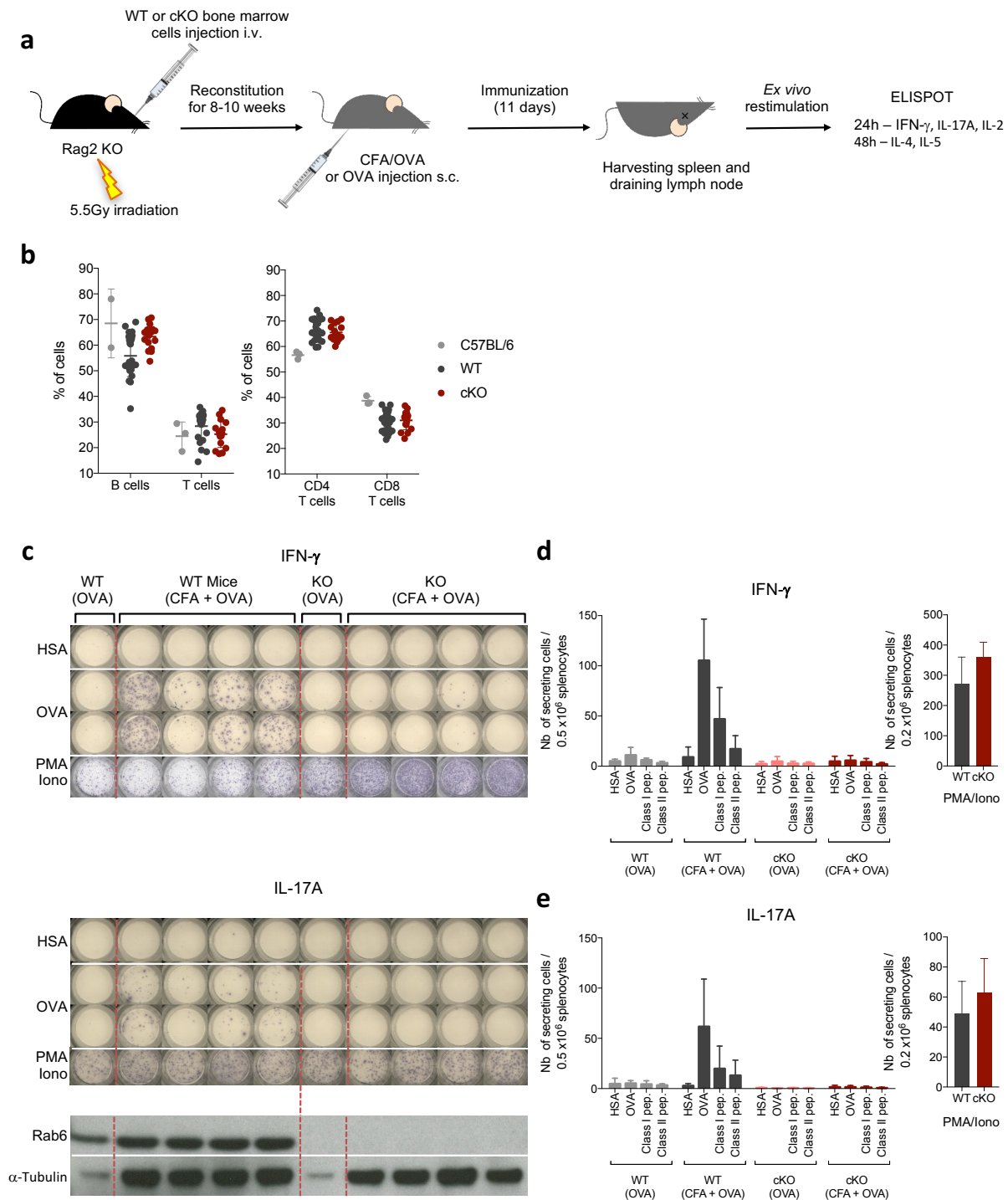


Figure 3.2.14. La réponse lymphocytaire T est abrogée en absence de Rab6. (a) Schéma expérimental. Les souris Rag2 KO dépourvues de lymphocytes T et B ont été reconstituées avec la moelle osseuse de souris WT ou Rab6 cKO afin d'obtenir des chimères hématopoïétiques exprimant des cellules T WT ou déficientes pour Rab6. Les chimères ont été immunisées avec la protéine ovalbumine (OVA) seule ou émulsifiée avec l'adjuvant complet de Freund (CFA+OVA) par injection sous-cutanée. La rate et le ganglion drainant de chaque souris ont été prélevés à jour 11 post-immunisation et les cellules ont été restimulées *ex vivo* et des ELISPOTs ont été réalisés après 24h, pour les réponses IFN γ , IL-17A et IL-2, et 48h pour les cytokines IL-4 et IL-5. (b) Analyse par cytométrie en flux de la reconstitution des compartiments B et T dans les souris Rag2 KO 8 à 10 semaines après l'injection de moelle osseuse. C57BL/6, souris contrôles. (c) ELISPOT représentatif des réponses IFN γ (haut) et IL-17A (bas) par les splénocytes et cellules de ganglions lymphatiques WT ou Rab6 cKO restimulés *ex vivo* avec un antigène irrelevant (HSA, albumine de sérum humain), l'ovalbumine (OVA) ou la PMA/ionomycine. Le panel du bas représente un immunoblot montrant l'expression de Rab6 et de la tubuline- α dans des lymphocytes T CD4⁺ isolés des ganglions lymphatiques. Chaque colonne représente 1 même souris. (d-e) Quantification par ELISPOT de la sécrétion d'IFN γ (d) et d'IL-17A (e) par les splénocytes et les cellules de ganglions lymphatiques restimulés *ex vivo* avec la HSA, l'OVA, le peptide de classe-I (OVA₂₅₇₋₂₆₄), le peptide de classe-II (OVA₃₂₃₋₃₃₉) (gauche) et la PMA/ionomycine (droite) (WT-OVA n=3 mice; WT CFA/OVA n=13; cKO-OVA n=3; cKO-CFA/OVA n=13). Chaque symbole représente une souris (b). Les données récapitulent 3 expériences (b,d,e ; moyenne, s.d.) ou sont représentatives de 3 expériences (c).

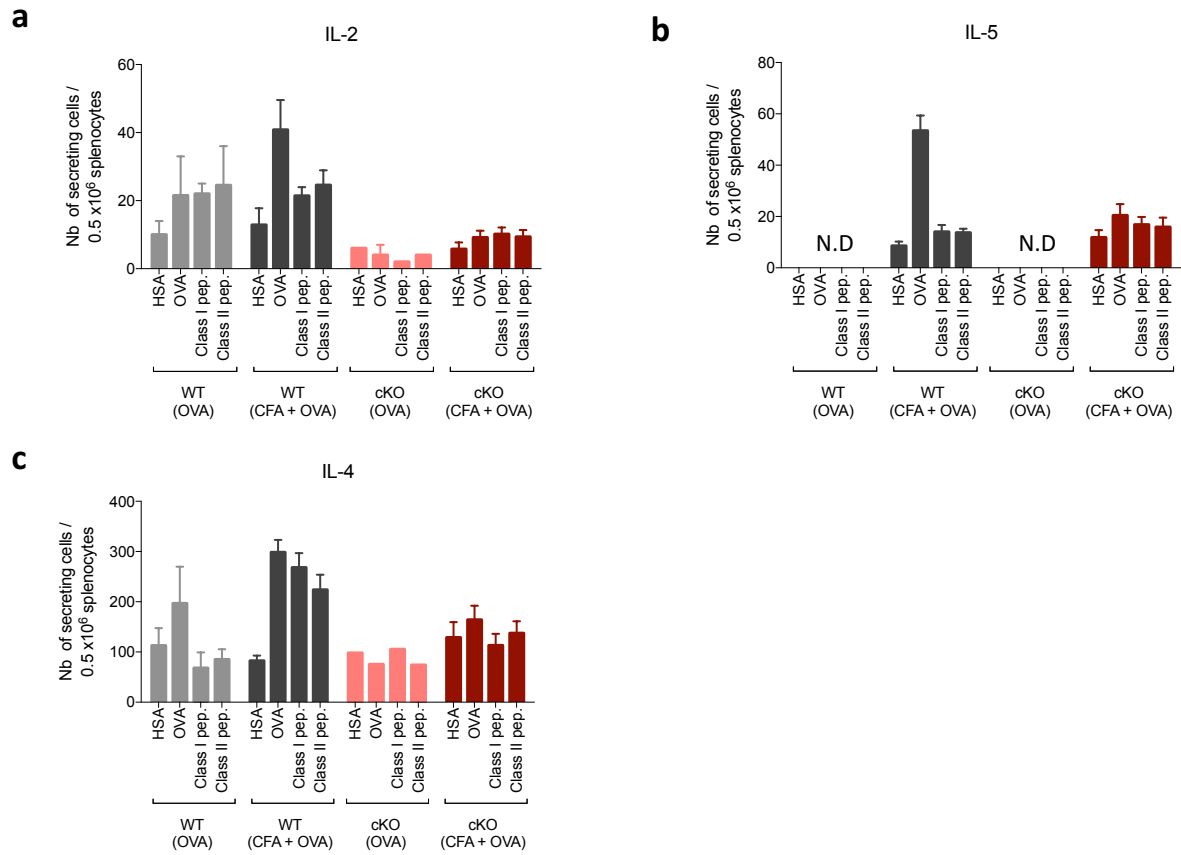


Figure 3.2.15. Réponse *in vivo* IL-2, IL-5 et IL-4 en absence de Rab6. (a-c) Quantification de la sécrétion d'IL-2 (a) d'IL-5 (b) et d'IL-4 (c) par les splénocytes et les cellules de ganglions lymphatiques restimulés *ex vivo* avec la HSA, l'OVA, le peptide de classe-I (OVA₂₅₇₋₂₆₄), le peptide de classe-II (OVA₃₂₃₋₃₃₉) (IL-2 WT-OVA n=2; IL-4 WT-OVA n=3; IL-2 WT-CFA/OVA n=8; IL-5 WT-CFA/OVA n=9; IL-4 WT-CFA/OVA n=12; IL-2 cKO-OVA n=2; IL-4 cKO-OVA n=1; IL-2 cKO-CFA/OVA n=8; IL-5 cKO-CFA/OVA n=6; IL-4 cKO-CFA/OVA n=12). Les résultats compilent 3 expériences (a-c; mean and s.d.).

3.2.9. Conclusions

Les conclusions que nous avons tirées de ce travail sont les suivantes :

- La fraction intracellulaire de LAT est internalisée depuis la membrane plasmique et est située dans un compartiment endocytaire Rab11+. Lors de la formation de la synapse immunologique, cette fraction internalisée recycle de façon polarisée vers la membrane plasmique (**Fig.3.2.1**).
- Bien que Rab11 soit le principal marqueur de colocalisation avec la fraction intracellulaire de LAT et que cette petite GTPase ait été décrite dans le recyclage de divers cargos dans différents types cellulaires, nous n'avons pas réussi à démontrer un rôle fonctionnel de Rab11 dans le transport de LAT et son recrutement à la synapse immunologique (**Fig.3.2.2**).
- En revanche, nos résultats suggèrent que LAT transite dynamiquement par le TGN où VAMP7 est principalement localisée (**Fig.3.2.3**) suggérant que LAT emprunte une voie de transport rétrograde entre les compartiments endosomaux et l'appareil de Golgi/TGN.
- Le rôle de deux partenaires canoniques de la voie de transport rétrograde, Rab6 et syntaxine-16, a été testé dans des cellules Jurkat (modèle leucémique humain) et nous avons pu observer un défaut de transport de LAT à la synapse immune en absence de ces deux protéines (**Fig.3.2.4** et **Fig.3.2.6**). Ce défaut a été confirmé dans les lymphocytes T CD4⁺ déficients pour Rab6 issus de souris génétiquement modifiées (**Fig.3.2.10**).
- Les défauts de recrutement de LAT à la synapse immunologique en absence de Rab6 sont accompagnés d'un défaut de phosphorylation de LAT (**Fig.3.2.4**) et d'une production déficiente d'IL-2 (**Fig.3.2.7**) dans les cellules T Jurkat. L'analyse des réponses T dans le modèle souris a confirmé que la réponse lymphocytaire tardive (prolifération) dans un système antigénique est impactée en absence de Rab6 et que ce défaut est intrinsèque aux lymphocytes T (**Fig.3.2.12**).
- Enfin, la réponse lymphocytaire T *in vivo* est absente dans les souris déficientes pour Rab6 (**Fig.3.2.14,15**).

Ainsi, ce travail avait pour objectif de caractériser la ou les voie(s) de transport intracellulaire empruntée(s) par LAT et son (leur) rôle dans le recrutement des vésicules LAT à la synapse immunologique. Nos observations nous ont permis de conclure que LAT suit une voie de recyclage à la synapse indépendante de Rab11 mais dépendante d'une voie de transport rétrograde entre les endosomes et le TGN définie par Rab6 et la syntaxine-16. L'appareil de Golgi est une organelle étroitement lié au centrosome et spécialisée dans la sécrétion de cargos. Nous proposons ainsi un modèle où la fraction endocytaire de LAT emprunte une voie de transport rétrograde vers le TGN qui contient la machinerie de sécrétion (VAMP7/VARP/Rab21). Dans les conditions d'activation, les remaniements du LT liés à la mise en place de la synapse immunologique conduirait à la sécrétion hautement polarisée du contenu golgien.

3.2.10. Contributions

Après avoir contribué à l'analyse du rôle de VAMP7, l'étude de l'implication de Rab6 dans l'activation de LAT a constitué le travail principal de ma thèse. J'ai ainsi réalisé les expériences d'imagerie en immunofluorescence allant de la mise au point des marquages et de l'acquisition au microscope à l'analyse des images de manière automatique ou semi-automatique (scripts détaillés en annexe), afin d'analyser le recrutement de LAT à la synapse. J'ai par ailleurs analysé les effets de plusieurs cibles (Rab11, Rab6, syntaxin-16) dans l'activation des cellules T Jurkat (biochimie, et expériences fonctionnelles *in vitro*). Enfin, j'ai caractérisé les souris Rab6 cKO et analysé les réponses lymphocytaires T CD4⁺ à la fois *in vitro* et *in vivo*.

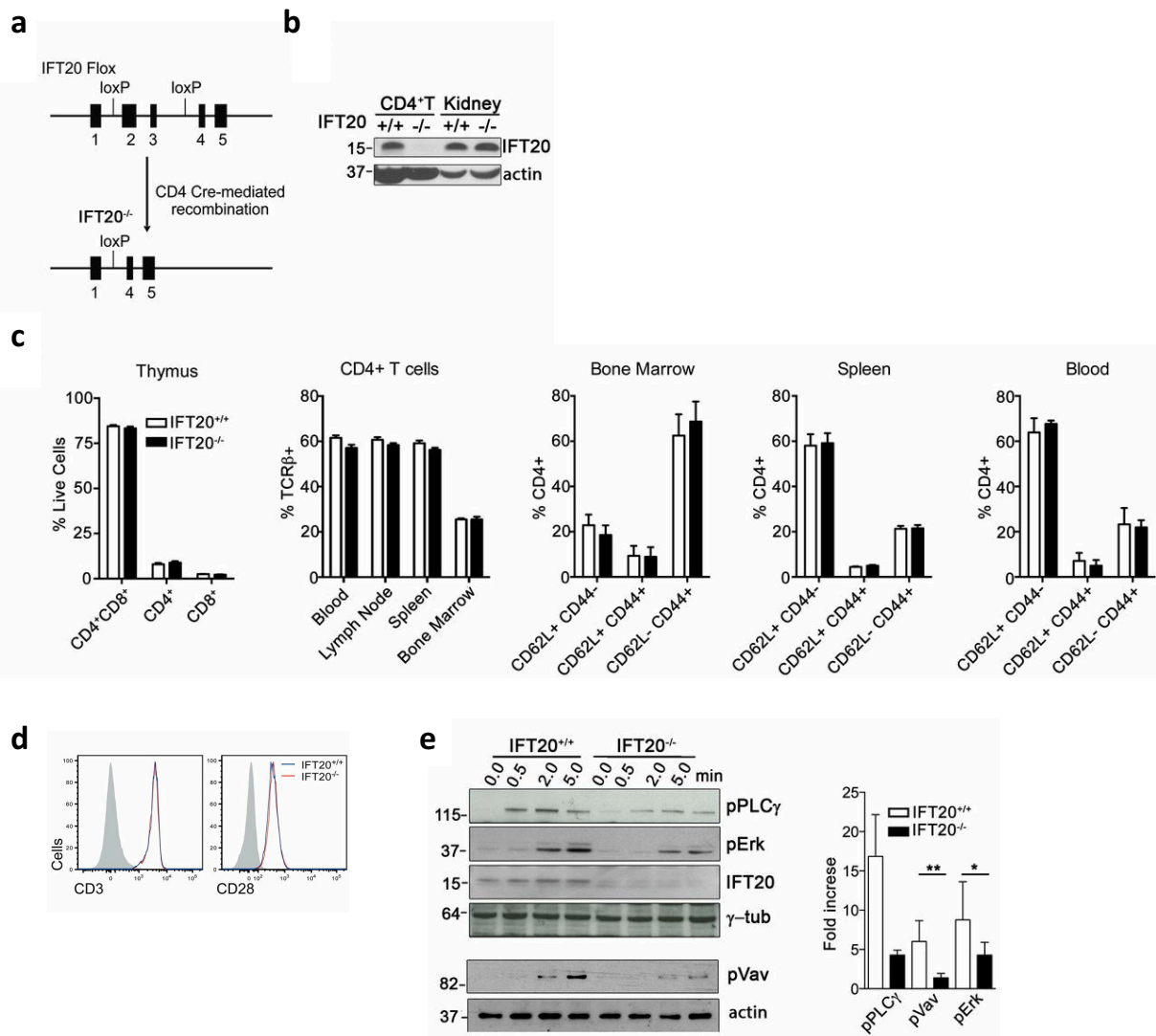


Figure 3.3.1. La signalisation TCR est déficiente dans les souris IFT20. (a) Stratégie de génération des souris IFT20 cKO, dont les exons 2 et 3 sont flanqués par des sites LoxP. Les souris ont été croisées avec une lignée exprimant la recombinaise Cre sous le promoteur du gène CD4 afin d'obtenir la délétion des exons 2 et 3. (b) Immunoblot montrant les protéines IFT20 et actine (contrôle de charge) dans les lymphocytes T CD4⁺ isolés de la rate, et dans les cellules totales de rein de souris IFT20 cKO et de souris contrôles. (c) Pourcentages des populations DP (CD4⁺CD8⁺) et SP CD4 et CD8 dans le thymus, des populations T CD4⁺ dans le sang, les ganglions lymphatiques, la rate et la moelle osseuse, et des populations T CD4 naïves (CD62L⁺CD44⁻), centrales/mémoires (CD62L⁺ CD44⁺), effectrices/mémoires (C62L⁻ CD44⁺) dans la moelle osseuse, la rate et le sang des souris IFT20 WT ou cKO. (d) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de CD3ε (gauche) et CD28 (droite) dans les souris IFT20WT ou cKO. (e) Immunoblot montrant la phosphorylation de PLCγ1, ERK1/2, VAV1 et l'expression de IFT20, γ-tubuline et actines (contrôles de charge) dans les souris IFT20 WT et cKO activées avec des anticorps activateurs solubles (anti-CD3ε/anti-CD28) pendant différents temps (droite). Quantification de l'intensité des signaux de protéines phosphorylées normalisée par l'intensité des signaux des contrôles de charges respectifs et les intensités des signaux de phosphorylation des cellules non stimulées. * P<0.05, ** P<0.01; ratio paired *t*-test (e). Les données compilent 3 expériences (c ; moyenne, s.d. ; neuf souris), plus de 3 expériences (e ; moyenne, s.e.m.), ou sont représentatives d'une expérience (b).

3.3. IFT20 contrôle l'activation lymphocytaire T

Les parallèles établis entre la synapse immunologique et la synapse neuronale (Dustin and Colman, 2002) nous ont poussé à analyser le rôle de VAMP7 dans le trafic intracellulaire des lymphocytes T. D'autres enseignements peuvent être tirés d'une autre structure cellulaire, le cil primaire, comme l'ont déjà souligné les groupes de Gillian M. Griffiths et Cosima T. Baldari (Onnis et al., 2016; Stinchcombe et al., 2015; Stinchcombe and Griffiths, 2014). Certains acteurs moléculaires impliqués dans le transport intraflagellaire sont en effet également impliqués dans la formation de la synapse immunologique et la signalisation lymphocytaire T. En particulier, la protéine de transport intraflagellaire IFT20 semble contrôler le transport polarisé et le recyclage du TCR (Finetti et al., 2015; 2014; 2009), ces résultats ayant été démontrés dans des lymphocytes T primaires humains et la lignée T Jurkat.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Cosima T. Baldari (Department of Life Sciences, University of Siena, Italy) et de Sebastian Amigorena, j'ai participé à l'analyse de l'activation des lymphocytes T issus de souris IFT20 cKO.

3.3.1. IFT20 contrôle la signalisation induite par le TCR

Afin de déterminer le rôle d'IFT20 dans l'activation lymphocytaire T *ex vivo* et *in vivo*, des souris dont les exons 2 et 3 ont été flanqués de sites LoxP ont été générées (IFT20^{flox/flox}) (**Fig.3.3.1a**). La délétion de ces deux exons dans les lymphocytes T a été obtenue après croisement des souris IFT20^{flox/flox} avec une lignée exprimant la recombinase Cre sous le promoteur du gène CD4 (IFT20^{flox/flox} CD4-Cre⁺ ou IFT20^{flox/flox} CD4-Cre⁻, ci-après respectivement notées IFT20 cKO et IFT20 WT). Comme attendu, la déplétion de la protéine IFT20 a été obtenue dans les lymphocytes T CD4⁺ alors que IFT20 était toujours exprimée dans les autres tissus (**Fig.3.3.1b**). Le développement thymique dans les souris IFT20 cKO était par ailleurs normal (**Fig.3.3.1c**). Aucune différence dans les pourcentages de lymphocytes T CD4⁺ n'était

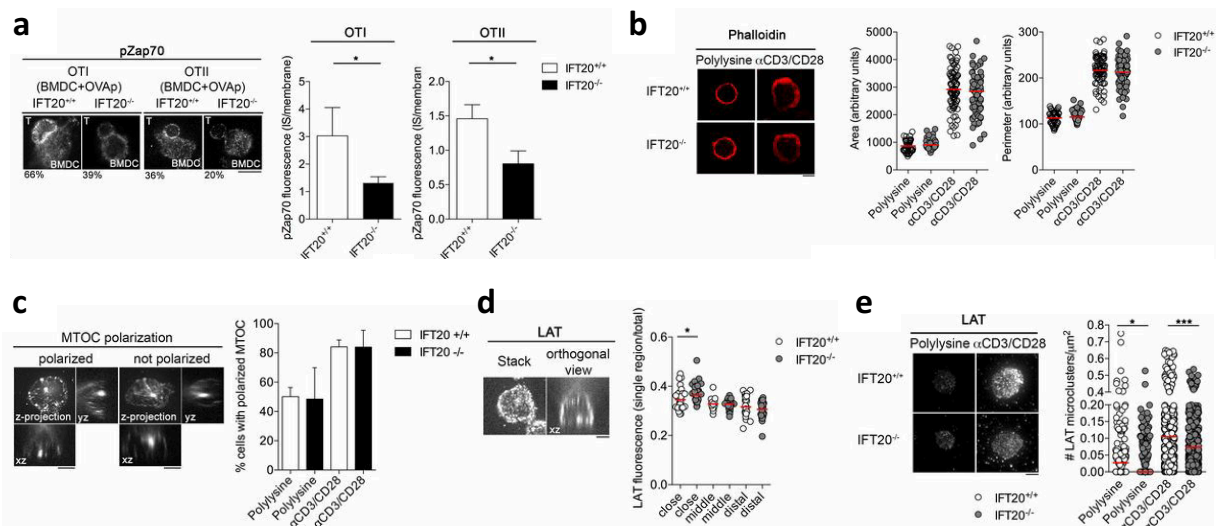


Figure 3.3.2. IFT20 contrôle la phosphorylation de ZAP70 et le recrutement de LAT à la synapse immunologique. (a-e) Analyse de la réponse précoce des lymphocytes T IFT20 cKO et contrôles. (a) Images en microscopie confocale (spinning-disk) montrant la phosphorylation de ZAP70 (Y493) dans les lymphocytes T OT-I et OT-II conjugués avec des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDCs), chargées respectivement avec les peptides de classe-I OVA₂₅₇₋₂₆₄ ou de classe-II OVA₃₂₃₋₃₃₉ (gauche, pourcentages de cellules positives pour phospho-ZAP70 en dessous de chaque image). A droite, quantification de l'intensité du signal phospho-ZAP70 à la synapse normalisée par l'intensité du signal à la membrane plasmique de la cellule entière (OT-I : WT=33 cellules, cKO=48 cellules ; OT-II : WT=54 cellules, cKO=47 cellules). (b-e) Les lymphocytes T CD4⁺ ont été déposés sur un substrat neutre (poly-L-lysine) ou activateur anti-CD3 ϵ /anti-CD28 pendant 10 minutes avant d'être fixés. (b) Images confocales (spinning-disk) montrant l'étalement des lymphocytes T marqués avec de la phalloïdine fluorescente (actine filamentueuse) (gauche) et quantification de l'aire et du périmètre des cellules (droite). (c) Images confocales (spinning-disk) montrant le recrutement du centrosome (tubuline- α) à la synapse (gauche, projections en Z et projections orthogonales YZ et XZ). A droite, quantification du pourcentage de cellules présentant une polarisation du centrosome vers la surface de contact entre les lymphocytes et la lamelle. (d) Images confocales montrant le recrutement du LAT endogène dans les lymphocytes (gauche, projection en Z et projection orthogonale). A droite, quantification des signaux de fluorescence LAT dans 3 zones de même taille et annotées comme proximale, médiane et distale par rapport à la surface de contact avec la lamelle. Les résultats ont été normalisés par la fluorescence totale de la cellule. (e) Images TIRF montrant le recrutement du LAT endogène dans le champ d'évanescence (gauche) et quantification de la densité de microclusters formés à la synapse (droite). Barres d'échelle : 10 μ m. * P<0.05, *** P<0.005; *t*-test non apparié non paramétrique (e,d) ; Les résultats récapitulent 2 expériences (b,d ; médiane), 3 expériences (e ; médiane) et 1 expérience (c ; moyenne, s.d.).

observée dans le sang, la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse indiquant que l'homéostasie des T était normale en périphérie (**Fig.3.3.1c**). Enfin, les proportions de cellules naïves ($CD62L^+CD44^-$), de cellules centrales/mémoires ($CD62L^+CD44^+$) ou de cellules effectrices/mémoires ($CD62L^-CD44^+$) dans le sang, la rate et la moelle osseuse étaient comparables entre les souris IFT20 cKO et les souris contrôles (**Fig.3.3.1c**).

L'expression de surface des molécules CD3 ϵ et CD28 étant normale en absence d'IFT20 (**Fig.3.3.1d**), la signalisation induite par leur activation a pu être analysée. Les phosphorylations de PLC γ 1, ERK1/2 et Vav1 étaient diminuées signant un défaut relativement précoce de la signalisation TCR (**Fig.3.3.1e**). Ces résultats étaient en accord avec les résultats obtenus dans la littérature montrant une signalisation TCR déficiente dans les lymphocytes T humains en absence d'IFT20 (Finetti et al., 2009).

3.3.2. Le recrutement de LAT aux sites d'activation du TCR est affecté en absence de IFT20

Afin d'analyser de manière plus précise les effets d'IFT20 sur les événements de signalisation ayant lieu à la synapse immunologique, les souris ont été croisées avec des souris OT-I ou OT-II exprimant le TCR transgénique respectivement restreint au CMH de classe-I ou au CMH de classe-II. Les lymphocytes T CD8 $^+$ OT-I ou CD4 $^+$ OT-II ont été activés avec des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDCs) chargées avec les peptides de classe-I OVA₂₅₇₋₂₆₄ ou de classe-II OVA₃₂₃₋₃₃₉. La phosphorylation de ZAP70 à la synapse immune analysée par microscopie confocale présentait, dans les deux systèmes transgéniques, une diminution du pourcentage de cellules positives et de l'intensité de fluorescence à la synapse (**Fig.3.3.2a**). Ces résultats confirment que IFT20 joue un rôle dans la signalisation très précoce à la synapse des lymphocytes T CD4 et CD8.

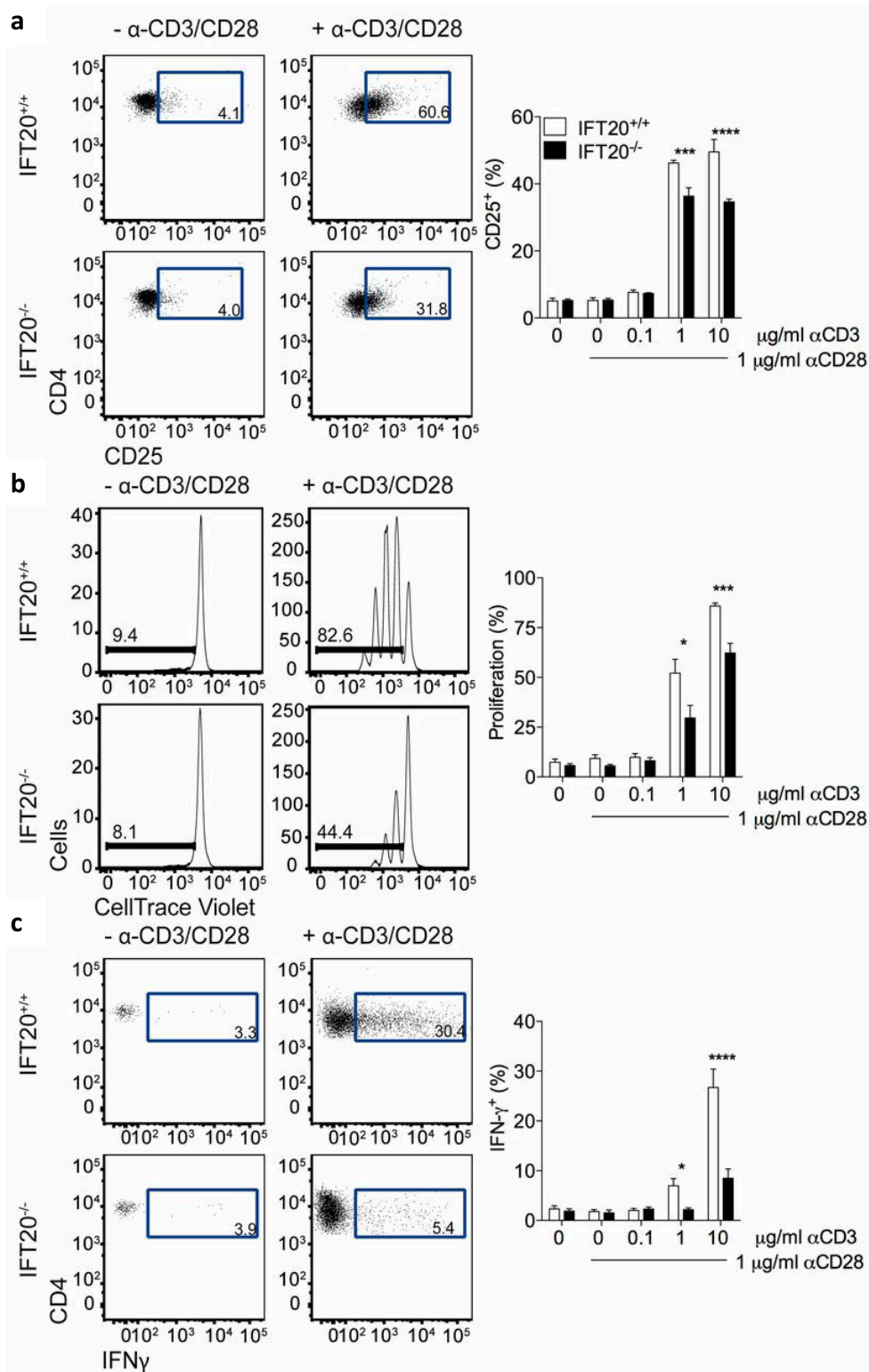


Figure 3.3.3. L'activation lymphocytaire T CD4⁺ est déficiente *ex vivo* est déficiente en absence d'IFT20. (a-c) Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs IFT20 WT ou cKO marqués avec un colorant de prolifération (CTV) ont été mis en culture en présence de différentes concentrations d'anticorps fixés anti-CD3_e et d'anticorps solubles anti-CD28 (1 µg/mL). (a) Après 20h de culture, l'expression du marqueur d'activation CD25 a été analysée par cytométrie en flux (gauche) et quantification des pourcentages de cellules CD4⁺CD25⁺ (droite). (b-c) Après 72h de culture, les cellules ont été restimulées pendant 6h en PMA/ionomycine, et la prolifération cellulaire (b) ainsi que la production d'IFN γ (c) ont été mesurées par cytométrie en flux (gauche). A droite, quantification des pourcentages de cellules entrées en prolifération (b) ou positives pour l'IFN γ (c). * P<0.05, *** P<0.005, **** P<0.001 ; Student *t*-test. Les résultats récapitulent 3 expériences (a-c ; moyenne, s.e.m.).

L'activation lymphocytaire T conduit à un remaniement du cytosquelette d'actine nécessaire à l'étalement des cellules et à la polarisation du centrosome vers la synapse (Martín-Cófreces et al., 2008; Quann et al., 2011; Yi et al., 2013). Cependant, l'étalement des cellules marquées avec un intercalant de l'actine polymérisée (phalloïdine, **Fig.3.3.2b**), ainsi que la polarisation du centrosome (**Fig.3.3.2c**), étaient comparables entre les lymphocytes T CD4⁺ IFT20 cKO et WT. En revanche, le transport de LAT à la synapse présentait un défaut. En effet, bien que la fraction intracellulaire de LAT proche du centrosome était, comme le centrosome, normalement polarisée à la synapse (**Fig.3.3.2d**), l'analyse par microscopie TIRF du nombre de microclusters de LAT recrutés à la synapse révélait un défaut de recrutement en absence d'IFT20 (**Fig.3.3.2e**).

Ces résultats indiquent que l'absence de la protéine de transport IFT20 dans les lymphocytes T CD4⁺ affecte la signalisation précoce induite par le TCR et le recrutement de LAT à la synapse immunologique.

3.3.3. IFT20 contrôle l'activation tardive *ex vivo* des lymphocytes T

Nous avons montré que certains aspects de la réponse lymphocytaire T précoce sont défectifs en absence de IFT20 (**Fig.3.3.2**). La réponse lymphocytaire T tardive a ensuite été testée en activant les lymphocytes T CD4⁺ naïfs déficients pour IFT20 avec différentes concentrations d'anticorps activateurs anti-CD3 ϵ et 1 μ g/mL d'anti-CD28. L'analyse du marqueur d'activation CD25 (**Fig.3.3.3a**), de la prolifération et de la production d'IFN γ (**Fig.3.3.3b,c**) révélait un défaut d'activation des lymphocytes T déficients en IFT20, confirmant *ex vivo* l'implication d'IFT20 dans l'activation des lymphocytes T par le TCR.

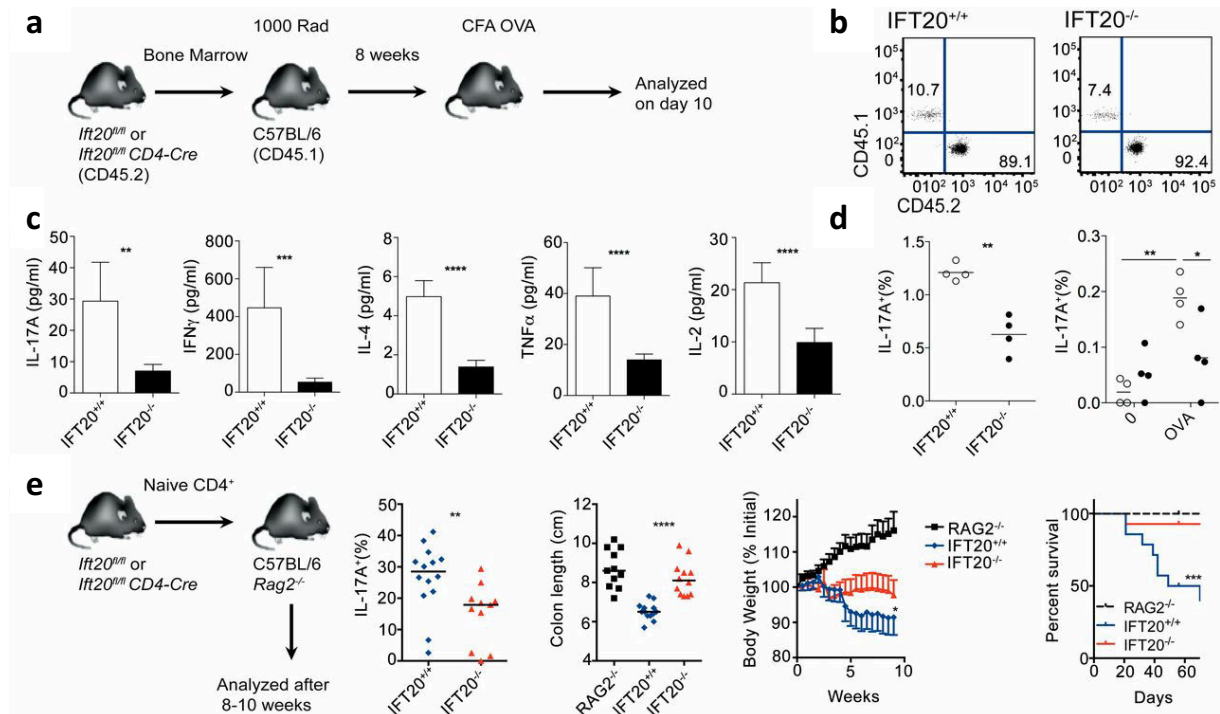


Figure 3.3.4. Défaut *in vivo* de la réponse lymphocytaire T CD4⁺ en absence d'IFT20 (a) Schéma expérimental suivi en (b-d). Des souris C57BL/6 CD45.1 irradiées puis reconstituées pendant 8 semaines avec la moelle osseuse de souris IFT20 WT ou cKO CD45.2 ont été immunisées pendant 10 jours avec de l'ovalbumine émulsifiée avec de l'adjuvant complet de Freund (CFA). (b) Analyse par cytométrie en flux des proportions de cellules CD45.1 et CD45.2 reconstituant les souris receveuses. (c-d) Les splénocytes ont été restimulés pendant 24h avec la protéine ovalbumine, et l'IL-17A, l'IFN γ , l'IL-4, le TNF α et l'IL-2 ont été mesurés dans les surnageants de culture (c), tandis que les proportions de lymphocytes T CD4⁺IL-17A⁺, préalablement restimulés en PMA/ionomycine (gauche) ou avec de l'ovalbumine (droite), ont été analysées par cytométrie en flux. (e) Modèle de colite induite. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (tri par cytométrie) IFT20 WT ou cKO ont été injectés dans des souris immunodéprimées Rag2 KO. Pendant tout le temps de l'expérience, les souris injectées ou non injectées (Rag2) ont été pesées. A 8-10 semaines post-injection ou lorsque que le point limite était atteint (perte de 20% du poids initial), les souris ont été sacrifiées. Graphes montrant dans l'ordre, les proportions de cellules T CD4⁺IL-17A⁺, la longueur du colon, le poids moyen de chaque groupe de souris exprimé en % du poids initial et les pourcentages moyens de survie en fonction du temps. * P<0.05, ** P<0.01 *** P<0.005, **** P<0.001 ; Student *t*-test. Les résultats récapitulent 2 expériences (c, 4 souris ; moyenne, s.e.m ; d, 4 souris ; médiane, s.e.m ; e, 14 souris ; moyenne, s.e.m.).

3.3.4. IFT20 contrôle l'activation *in vivo* des lymphocytes T

L'activation lymphocytaire T a enfin été testée *in vivo*. Pour cela, des cohortes de chimères hématopoïétiques ont été générées par reconstitution de souris C57BL/6 préalablement irradiées et exprimant le marqueur congénique CD45.1 avec la moelle osseuse de souris IFT20 cKO ou WT qui exprime le marqueur congénique CD45.2 (**Fig.3.3.4a**). Huit semaines après injection, le compartiment CD45.2 était presque entièrement reconstitué (**Fig.3.3.4b**). Dix jours après immunisation avec la protéine OVA émulsifiée en adjuvant complet de Freund (CFA), les splénocytes étaient restimulés et la réponse cytokinique analysée. Les splénocytes déficients pour IFT20 présentaient des défauts de sécrétion d'IL-17, IFN- γ , IL-4, TNF- α et IL-2, témoignant d'un défaut général d'activation (**Fig.3.3.4c**). Il est probable que ces défauts aient été liés à une diminution de la production de cytokines puisque l'analyse par cytométrie en flux des splénocytes IFT20 cKO restimulés révélait une diminution de la proportion de cellules produisant de l'IL-17 par rapport aux cellules issues des souris contrôles (**Fig.3.3.4d**). Ces résultats indiquent le rôle de la protéine IFT20 dans la réponse des lymphocytes T à une immunisation CFA/OVA.

Afin de documenter plus avant la réponse lymphocytaire T *in vivo* en absence d'IFT20, un modèle de colite induite a été utilisé et qui constitue un second modèle antigénique. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs polyclonaux (dépourvus de lymphocyte T régulateurs) ont été injectés dans des souris Rag2 KO dont les compartiments T et B sont « vides ». Classiquement dans ce modèle, les lymphocytes T s'activent et induisent une inflammation intestinale non contrôlée du fait de l'absence de lymphocytes T régulateurs. La réponse lymphocytaire T étant majoritairement polarisée Th17 dans ce modèle, les ganglions lymphatiques mésentériques (en contact avec les intestins) ont été prélevés et la production intracellulaire d'IL-17 a été analysée dans les lymphocytes T CD4⁺ par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules déficientes pour IFT20 produisant de l'IL-17 était réduit par rapport aux cellules contrôles. Par ailleurs, les souris injectées avec des cellules WT présentaient une perte de poids, un raccourcissement et un épaississement du colon et une diminution

de leur survie, induits par l'inflammation (**Fig.3.3.4e**). Les souris injectées avec des lymphocytes T CD4⁺ naïfs déficients pour IFT20 étaient protégées de l'inflammation. Elles présentaient, une taille de colon normale, une perte de poids limitée ainsi qu'une survie proche des souris Rag2 KO non injectées. Cette absence de colite induite par les lymphocytes T déficients pour IFT20 reflète leur incapacité à s'activer.

Ces résultats attestent qu'IFT20, une protéine du transport intraflagellaire présente dans le Golgi et jouant un rôle crucial dans l'assemblage et le maintien du cil primaire (ref), joue également un rôle important dans l'activation des lymphocytes T *in vivo*.

3.3.5. Conclusions

Cette étude confirme les résultats obtenus chez l'homme sur le rôle d'IFT20 dans l'activation lymphocytaire T et documente de manière approfondie son rôle dans la réponse T *ex vivo/in vivo* chez la souris. Ainsi, les conclusions tirées chez la souris sont les suivantes :

- IFT20 contrôle la signalisation précoce des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Des défauts de la phosphorylation de ZAP70, et des molécules associées à LAT (PLC γ 1, VAV1) sont observés en absence d'IFT20 bien que la réponse lymphocytaire précoce (remaniement de l'actine, polarisation du centrosome) soit normale.
- En absence d'IFT20, LAT est polarisée à la synapse mais son transport terminal à la synapse est déficient.
- La réponse tardive *ex vivo* de cellules T activées avec des anticorps activateurs (expression de CD25 et d'IFN γ , prolifération) est impactée par l'absence d'IFT20.
- IFT20 joue un rôle *in vivo* dans la réponse des lymphocytes T.

3.3.6. Contributions

Ce projet a principalement été mené par Omar Vivar de l'équipe de Sebastian Amigorena et Giulia Masi de l'équipe de Cosima T. Baldari. J'y ai contribué en analysant le recrutement du centrosome et de LAT à la synapse immunologique ainsi

que l'activation des lymphocytes par biochimie. J'ai également participé aux discussions et à l'élaboration du projet.

Les résultats sont décrits de manière plus détaillée dans l'article « IFT20 controls LAT recruitment to the immune synapse and T-cell activation in vivo » publié dans *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS), ci-après.

PARTIE 4 – DISCUSSION

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à comprendre les voies de trafic intracellulaire de LAT nécessaires au recrutement de cet adaptateur de la signalisation à la synapse immunologique. Nous avons tenté de comprendre le rôle de ce transport dans l'activation lymphocytaire T. Afin de définir ces voies de transport intracellulaire, nous nous sommes principalement intéressés à trois acteurs du transport intracellulaire : la protéine SNARE vésiculaire VAMP7, les petites GTPases Rab6 ainsi que la protéine de transport intraflagellaire IFT20.

Le travail scientifique réalisé au cours de ma thèse a contribué à répondre à ces questionnements par l'utilisation de techniques diverses, ce qui constitue le travail de recherche en laboratoire d'une manière générale. Mais, ce travail de thèse a surtout consisté en un apprentissage scientifique, à savoir : *i.* apprendre à poser les bonnes questions, *ii.* choisir plusieurs stratégies complémentaires pour y répondre, *iii.* interpréter les données de manière rigoureuse mais aussi intègre, *iv.* savoir proposer des modèles basés sur nos observations et celles de la littérature. L'ordre et le contenu de ces phases de la recherche et de l'apprentissage scientifiques sont certainement différents d'un chercheur à l'autre ou d'une personnalité à l'autre, mais dans mon cas ont été importantes durant ma thèse. Cela a peut-être été rendu plus difficile par le fait que les choix des candidats étudiés dans le transport de LAT étaient biaisés par nos hypothèses, et n'étaient pas tirés de criblages génétiques ou protéomiques. Pour autant, ces choix étaient motivés par nos connaissances tirées de la littérature et, plusieurs partenaires des voies de transport ont été analysés afin de réduire/confirmer nos champs d'investigation (les v-SNAREs de la famille des brévinines, VAMP7, VARP, Rab21, Rab11, Rab6a/a' ou encore la syntaxine-16). Cet apprentissage est certainement passé par des erreurs de raisonnement ou des moments de doute qui ont sans doute été bénéfiques à l'avancée des travaux. Ce travail a également fait face à des challenges techniques qu'il a fallu et qu'il faut encore aujourd'hui relever.

Je souhaiterais ainsi dans cette discussion revenir sur les étapes qui ont tracé mon travail de thèse, appuyer/défendre mais aussi critiquer nos raisonnements et nos

approches dans deux parties. Je commencerai ainsi par expliquer et critiquer les choix des méthodes et approches que nous avons employées dans ces travaux et je mettrai également en perspectives ces méthodes au vu des résultats obtenus. Je continuerai par discuter nos résultats en commentant notamment nos perspectives de recherche.

4.1. Choix et critiques des méthodes ou approches employées

La majeure partie du travail présenté dans ce manuscrit a été réalisée dans le temps de la thèse et la complexité de ce sujet portait sur l'aspect pluridisciplinaire (immunologie, signalisation, trafic intracellulaire) comprenant un grand nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires. Cela nous a donc demandé une certaine capacité à faire des choix (pas toujours faciles) dans les questionnements mais aussi dans les approches employées. De plus, un certain nombre d'optimisations des techniques ont été nécessaires et ce travail a dû également répondre à plusieurs « challenges » techniques que je discuterai ici dans un premier temps.

4.1.1. Les modèles biologiques employés

4.1.1.1. L'approche par perte de fonction

Les hypothèses que le transport de LAT pouvait être dépendant d'un transport rétrograde depuis les endosomes vers l'appareil de Golgi et d'une voie de sécrétion depuis l'appareil de Golgi vers la synapse immunologique a motivé nos approches d'extinction de l'expression de protéines SNAREs comme VAMP7 ou la syntaxine-16 et les petites GTPases Rab6 et Rab11. Cette approche a été réalisée à l'aide de lentivirus codant pour des shRNA spécifiques de ces protéines. Dans un second temps, et afin de valider nos observations faites *in vitro*, nous avons utilisé des souris invalidées pour VAMP7, Rab6 ou la protéine de transport intraflagellaire IFT20.

L'approche lentivirale d'extinction de l'expression de candidats au transport de LAT

L'approche lentivirale adoptée afin d'éteindre l'expression de nos protéines d'intérêt a constitué un outil précieux, mais s'est parfois révélée délicate lorsqu'elle n'était pas rigoureusement entreprise. Ainsi, cette stratégie consistait à cribler 5 shRNAs commerciaux différents (7 pour Rab6) dans les cellules Jurkat et ciblant différentes régions des ARNm. L'analyse de ces shRNAs résidait principalement dans leur efficacité de déplétion, la viabilité des cellules, l'expression totale de LAT et la production/sécrétion d'IL-2. A la suite de ce criblage, nous avons choisis 2 shRNAs et la principale difficulté a résidé dans ce choix. En effet, le choix de ces 2 shRNAs doit refléter un effet biologique réel qui n'est pas lié à un « off-target ». Par expérience, je peux aujourd'hui dire que pour 5 à 7 shRNAs analysés pour 7 à 8 tests différents, il est difficile d'obtenir 2 shRNAs ayant exactement les mêmes effets. Nous avons donc cherché à exclure les shRNAs aux effets aberrants, et choisis ceux représentatifs. Il est toutefois notable que les effets des shRNAs choisis sont relativement robustes d'une expérience à l'autre. Enfin, nous avons également choisi de réaliser des extinctions aiguës à l'aide de ces shRNAs. En effet, les cellules exprimant les shRNAs étaient utilisées au plus tard 5 jours après la transduction et nous n'avons pas gardé les cellules « silencées » à long terme afin d'éviter l'adaptation des cellules par compensation à l'absence d'expression d'une protéine.

En conclusion, les observations liées à cette approche justifient par ailleurs la multitude de modèles que nous avons employés dans nos différentes études afin de confirmer les effets biologiques observés dans le modèle d'extinction par shRNAs.

Les contrôles spécifiques à nos études

Les approches par perte de fonction sont des approches qui se sont révélées très informatives dans de nombreux systèmes. Cependant, dans notre cas, les protéines du trafic intracellulaire sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires et il est toujours difficile d'exclure que les effets observés ne sont pas liés au transport d'autres cargos que LAT. Notamment, nous activons les cellules par

engagement du complexe TCR/CD3 et CD28 avec des anticorps activateurs anti-CD3 ϵ et anti-CD28 ou bien avec des CPAg. Pour cette raison, les cellules éteintes ou KO pour nos protéines d'intérêt ont systématiquement été phénotypées pour la présence à la surface des cellules d'au moins un composant du complexe TCR/CD3 et de CD28. L'expression de surface de ces marqueurs n'était pas changée en absence de VAMP7, Rab6 ou encore d'IFT20. Cela n'exclut cependant pas leur rôle dans le transport du TCR ou d'autres cargos nécessaires à l'activation T après engagement par le pCMH. Nous avons ainsi essayé de fournir des preuves que le recrutement ou bien la phosphorylation des molécules présentes « en amont » de LAT (TCR, CD3 ζ ou encore ZAP-70) n'étaient pas déficientes dans les modèles de perte de fonction employés. De même, la réponse lymphocytaire T tardive dans ces systèmes a très souvent été étudiée par l'analyse de la sécrétion de cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-17A, IL-5, IL-4). Nous avons ainsi toujours essayé de coupler ces analyses avec des mesures de la production de ces cytokines, afin d'exclure dans la mesure du possible l'effet des molécules de transport d'intérêt dans la sécrétion des cargos de cytokines. Lorsque cela n'était pas possible, comme pour la mesure de sécrétion de cytokines par ELISPOT, un contrôle positif de la sécrétion des cellules cKO traitées par PMA/Ionomycine a été utilisé.

4.1.1.2. Les modèles cellulaires

Les cellules T Jurkat sont des cellules T leucémiques proliférantes (Schneider et al., 1977). Cette lignée a constitué un outil important dans la caractérisation de la biologie lymphocytaire T et notamment de la signalisation médiée par le TCR. Notamment, le crible de mutations induites expérimentalement par le groupe d'Arthur Weiss a permis de mettre en évidence et de caractériser différentes molécules primordiales dans l'activation lymphocytaire T comme p56^{Lck} (cellules JCAM1) ou bien LAT (cellules JCAM2) (Goldsmith et al., 1988; Goldsmith and Weiss, 1988; 1987). Le modèle de lignée cellulaire Jurkat a ainsi constitué dans nos études un modèle facile d'utilisation notamment pour les extinctions d'expression de gènes et les analyses de la phosphorylation des protéines de signalisation par immuno-blot. Un désavantage lié

à cette lignée est, cependant, la difficulté que nous avons à les transfecter avec différentes constructions codant pour diverses protéines dont les formes dominantes négatives ou hyperactives de protéines de transport intracellulaire (par exemple VARP). Les taux de transfection par électroporation classique varient le plus souvent de 5% à 30% selon les constructions (codant aussi pour la GFP, mesurée par cytométrie en flux). Cela rend plus compliquée leur étude sur le plan moléculaire (immunofluorescence) mais surtout sur le plan fonctionnel (signalisation, sécrétion de cytokines, etc.).

Parfois critiqué, ce modèle reste encore aujourd'hui admis par la communauté et est encore utilisé dans de nombreuses études. Néanmoins, bien que les cellules T Jurkat constituent un modèle commode pour les analyses biochimiques ou encore pour la microscopie, ce modèle n'offre qu'un potentiel limité de tests fonctionnels. Dans nos systèmes d'activation en présence de SEE et de cellules présentatrices d'antigène (cellules B Raji), les cellules Jurkat ne sécrètent pas d'IFN- γ et seulement de très faibles concentrations de TNF- α . Par ailleurs, les cellules T Jurkat sont par définition anormales puisque leur signalisation est altérée par l'absence de PTEN, un régulateur négatif de la voie PI3K (Shan et al., 2000). Cela peut constituer un problème dans l'analyse de certaines voies de trafic intracellulaire, notamment la sécrétion de vésicules dont le bourgeonnement depuis le TGN serait dépendant de Rab6 et de PI3K (Jones and Howell, 1997). Nous avons pu par ailleurs constater que les cellules Jurkat en notre possession répondent peu à la PMA/Ionomycine confirmant que certaines voies de signalisation sont altérées dans ce modèle. Il convient donc d'une manière générale de vérifier que les observations faites dans ce modèle ne sont pas liées à la nature leucémique de ce modèle. Ainsi, un modèle de lymphocytes T primaires CD4⁺ humains invalidés avec des shRNAs a été mis au point dans le laboratoire par Armelle Bohineust, une ancienne étudiante en thèse. De manière brève, l'approche lentivirale sur cellules T primaires requière leur pré-activation afin de les maintenir en vie mais aussi afin d'obtenir une intégration des shRNAs et une extinction suffisante de l'expression des protéines étudiées. Cette approche a permis de confirmer les résultats obtenus dans les cellules Jurkat éteintes pour VAMP7.

Cependant, cette technique pourrait aussi être critiquée car l'utilisation des blastes T obtenus par pré-activation des lymphocytes T peut constituer un biais dans l'analyse de certaines voies moléculaires. Notre expérience ainsi que les observations faites dans la littérature (Kabanova et al., 2016) suggèrent que la signalisation entre des lymphocytes T naïfs et celle des blastes peuvent être différentes. Un troisième type de modèle a été mis en place au laboratoire et a consisté en l'utilisation de différentes lignées de souris génétiquement modifiées. Ces modèles ont été utilisés pour l'analyse *in vivo* de la fonction des lymphocytes T CD4⁺ mais aussi pour étudier leur biologie *ex vivo*.

Les résultats présentés dans ce manuscrit montrent que les défauts de recrutement de LAT liés à l'absence de VAMP7 et observés dans les cellules T Jurkat, ont pu être validés dans leur ensemble à la fois dans les cellules primaires humaines et dans les cellules de souris. Cela permet donc de valider nos modèles Jurkat et de lymphocytes T primaires humains dans les voies que nous analysons, à savoir le trafic intracellulaire de LAT. Cela peut donc justifier l'utilisation de ce modèle dans le reste de nos études.

4.1.1.3. Modèle de souris KO totales, KO non conditionnelles inductibles et KO conditionnelles non inductibles

Choix et comparaison des modèles

Trois modèles différents de souris invalidées pour chacun un gène d'intérêt ont été utilisés dans les travaux décrits dans ce manuscrit : *i.* les KO totaux VAMP7^{-f/y}, *ii.* les KO conditionnels pour Rab6a/a' (Rab6^{flox/flox} CD4-Cre⁺) et *iii.* les KO conditionnels pour IFT20 (IFT20^{flox/flox} CD4-Cre⁺).

Les souris KO VAMP7 ont été générées et fournies par le laboratoire de Thierry Galli et sont viables (Danglot et al., 2012). Ces souris ont constitué un outil important pour l'analyse *ex vivo* du rôle de VAMP7 dans la réponse des lymphocytes T CD4⁺ extraits de ces souris. Nous avons ainsi pu montrer que la réponse lymphocytaire T CD4⁺ induite *ex vivo* dans un système antigénique (OT-II) est déficiente en absence

de VAMP7. Dans le même système de présentation antigénique, nous avons également tenté de démontrer *in vivo* le rôle de VAMP7 dans la réponse lymphocytaire T. Afin d'exclure la contribution de VAMP7 dans d'autres processus de l'immunité comme la présentation antigénique, ces analyses de la réponse T n'ont pu être réalisées que par des transferts adoptifs des lymphocytes T CD4⁺ WT ou KO OT-II dans des souris receveuses (non montré). L'immunisation de ces souris avec des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse n'a montré qu'une tendance à la diminution de la prolifération et de l'expression du marqueur précoce d'activation CD69 dans les souris VAMP7 KO. Ces défauts partiels observés *ex vivo* et *in vivo*, nous ont poussés à émettre l'hypothèse que le défaut d'expression de VAMP7 pouvait être compensé par d'autres acteurs du trafic intracellulaire, notamment à de fortes doses de peptides antigéniques. Afin de palier à ces éventuelles compensations, nous avons ainsi pensé croiser la lignée de souris VAMP7^{flox/Y} avec des souris exprimant la recombinase CreER^{T2} sous le promoteur Rosa26 qui est induit ubiquitairement par le traitement au tamoxifène des cellules ou bien des souris. Cela offrait des perspectives intéressantes car ce Knock-In développé par le laboratoire d'Anton Berns nous aurait permis de dépléter de manière aigüe VAMP7 et, d'une manière plus générale, des protéines de transport intracellulaire dont les fonctions sont sujettes à des redondances avec d'autres protéines de la même famille. Un système d'autant plus adapté à notre étude était une recombinase CreER^{T2} exprimée sous le promoteur de CD4 (Aghajani et al., 2012). A l'époque où nous envisagions de tel croisement, cette lignée n'avait cependant pas été caractérisée d'un point de vue immunologique et nous avons choisi d'exclure ce modèle.

Les effets de compensation entre des protéines qui ont des fonctions chevauchantes sont particulièrement vrais pour les petites GTPases Rab. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de travailler en première intention avec des lignées Rab6^{flox/flox} Rosa26-CreER^{T2+/+}. Cependant, il est apparu que l'induction de la CreER^{T2} par le tamoxifène dans des lymphocytes T CD4⁺ WT altère fortement leur prolifération mais aussi le recrutement de LAT à la synapse immunologique mesuré par microscopie TIRF. Cet effet de la recombinase CreERT2 n'a pas pu être pallié par

la dilution de son nombre de copies dans le génome des souris ($Rosa26-CreER^{T2+/-}$). Par ailleurs, dans la mesure où le KO total de Rab6 est létal, nous avons réalisé des chimères hématopoïétiques mixtes reconstituées avec la moelle osseuse de souris CD3 ϵ KO (produisant des lymphocytes B mais pas de lymphocytes T), et de souris Rab6^{wt/wt} ou Rab6^{flox/flox} $Rosa26CreER^{T2+/-}$. Nous n'avons cependant pas réussi à induire de déplétion de Rab6 *in vivo* dans le compartiment des lymphocytes T que ce soit par l'utilisation de nourriture enrichie en tamoxifène ou bien par des injections répétées de tamoxifène, suggérant que ce modèle n'était pas non plus adéquat pour l'étude de Rab6 dans la réponse immunitaire *in vivo*. Ainsi, bien que les modèles de KO inductibles semblaient en théorie appropriés à nos études, ils se sont révélés plus complexes dans leur utilisation que prévu. Nous avons ainsi choisi de croiser les lignées de souris Rab6 et IFT20 avec une lignée de souris exprimant la Cre sous le promoteur de CD4. Cette lignée s'est révélée plus commode d'utilisation puisque les délétions géniques conditionnelles induites par la Cre sont réalisées dans les cellules ayant le promoteur de CD4 actif, à savoir principalement, les lymphocytes T CD4⁺ mais aussi les lymphocytes T CD8⁺ à un moment de leur différenciation dans le thymus. La lignée CD4-Cre est néanmoins une lignée transgénique et il n'est pas possible de contrôler le nombre de copies de la Cre transmis entre deux souris même issues d'une même portée. Il n'est pas exclu que même une recombinaison Cre non inductible puisse induire un biais dans les expériences. Afin de limiter au maximum cet éventuel biais, j'ai choisi de toujours comparer entre elles des souris Rab6 cKO avec des souris WT CD4-Cre⁺ provenant de la même colonie. Il est cependant vrai qu'un tel système de croisement est contraignant en termes d'espace en animalerie mais aussi en terme de nombre de souris d'intérêt générées qui est « aléatoire » du fait de la nature transgénique du gène codant pour la Cre. Ainsi, afin de réaliser des expériences *in vivo* sur des nombres suffisants de souris, nous avons réalisé des chimères hématopoïétiques reconstituées avec la moelle osseuse de souris Rab6 WT ou Rab6 cKO. La génération de ces cohortes nous a également permis d'obtenir des souris dont les systèmes immunitaires se développent en parallèle ce qui limite les biais liés aux différences d'âges des systèmes immunitaires des souris.

Analyse des compartiments immunitaires

Les compartiments immunitaires myéloïdes et lymphoïdes dans les différents modèles de souris que nous avons utilisés ont systématiquement été analysés. Cela se justifie particulièrement pour les souris VAMP7 KO pour lesquelles des défauts dans différents compartiments autres que les lymphocytes T auraient pu être attendus puisque VAMP7 est exprimé ubiquitairement. Pour les trois modèles de souris VAMP7 KO, Rab6 cKO ou IFT20 cKO, les analyses des nombres et des pourcentages de cellules dans les différents compartiments immunitaires myéloïdes n'ont pas révélé de défauts de développement de ces compartiments. Par ailleurs, comme il a été souligné dans l'introduction, le développement thymique des lymphocytes T nécessite la machinerie de signalisation TCR. Notamment, LAT est requise pour les sélections positives et négatives (Sommers et al., 2005; W. Zhang et al., 1999). De manière surprenante, bien que des défauts de signalisation associés à LAT aient été révélés dans les lymphocytes T périphériques, les compartiments lymphoïdes et plus particulièrement les compartiments des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ étaient normaux dans les souris invalidées pour VAMP7, Rab6 ou IFT20. L'analyse du développement thymique n'a pas non plus montré de défaut majeur. Cependant, une analyse quantitative ne suffit pas. Des défauts qualitatifs de la sélection thymique pouvaient exister. Nous avons notamment testé un éventuel biais du répertoire par l'analyse non exhaustive des segments variables V α et V β du TCR dans les souris VAMP7 KO et Rab6 cKO mais aucune différence majeure n'a pu être mise en évidence. Enfin, les souris déficientes pour LAT Y136 présentent des défauts importants de différenciation thymique mais une proportion de T est toutefois capable de passer en périphérie où elles acquièrent un phénotype hyper-réactif (Aguado et al., 2002; Sommers et al., 2002). Les lignées de souris VAMP7 KO, Rab6 cKO ou bien IFT20 cKO ne présentent cependant pas ce phénotype. Plusieurs explications d'une production normale de lymphocytes T dans nos lignées de souris invalidées peuvent cependant être envisagées et que je classe par ordre :

- i. La signalisation dépendante de LAT est diminuée mais pas totalement abrogée en absence de VAMP7 ou Rab6 possiblement parce que la fraction

de LAT à la membrane plasmique est capable de signaler. Cette signalisation pourrait être suffisante pour la différenciation thymique.

- ii.* La fraction vésiculaire de LAT n'est pas nécessaire à la signalisation dans les thymocytes.
- iii.* D'autres protéines du transport intracellulaire sont requises au transport de LAT lors de la différenciation thymique et leur expression est « down-modulée » dans les T périphériques.

4.1.2. Les modèles d'activation employés

Plusieurs modèles d'activation des lymphocytes T ont été utilisés dans nos différents travaux et ne se sont pas toujours révélés équivalents. Je souhaiterais donc revenir sur ces différents modèles.

4.1.2.1. L'activation avec des anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28

Anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 solubles

Le choix des modèles d'activation avec des anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 a principalement été motivé par le type d'expérience réalisée. Notamment chez la souris, dans un système polyclonal où il n'était pas possible d'utiliser un antigène donné, ce mode d'activation « antigène non spécifique » s'est révélé particulièrement utile pour l'analyse par immuno-blot de la signalisation. Ce modèle paraît cependant très réducteur lorsqu'on le compare au modèle de la synapse immunologique basé sur le recrutement du MTOC, le recrutement de compartiments intracellulaires et de vésicules de signalisation aux sites d'activation du TCR ou encore le mouvement de microclusters. Il a cependant été remarqué que même dans les conditions d'activation avec des anticorps solubles, une aggrégation des molécules de TCR signalisant dans une zone de la cellule appelée zone de « capping » (Smith et al., 1997) serait également le site d'un trafic membranaire (C.-W. Yang et al., 2016) et pourrait être comparée à une « pseudo-synapse » organisée par le lymphocyte T lui-même. De

plus, nous avons réussi à résumer avec des anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 les défauts de phosphorylations de LAT observés avec des CPAg suggérant que cette méthode reste adaptée à nos études.

Chez la souris, nous avons tenté des activations plus physiologiques dans un système monoclonal de lymphocytes T issus de souris croisées sur un fond OT-II et activées avec des CPAg chargées avec le peptide antigénique OVA₃₂₃₋₃₃₉. Les résultats de l'analyse de la phosphorylation des protéines n'ont cependant pas été concluants et nous utilisons encore aujourd'hui des anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28 pour l'analyse par phospho-blot.

Anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 fixés

L'activation des lymphocytes T humains et de souris a aussi été réalisée sur des substrats recouverts d'anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28. Cette approche était nécessaire à l'analyse des microclusters de signalisation par microscope TIRF dont l'incidence rasante du laser d'excitation permet l'observation de microclusters sur une épaisseur de 60 à 150nm et ainsi d'éviter tout biais lié à une fluorescence hors-focus. Par définition, cela n'aurait donc pas pu être obtenu avec des CPAg et l'étalement des cellules sur un substrat artificiel est donc requis. Bien que cette approche ait pour objectif de mimer une synapse immunologique (vue d'en face), le fait que les anticorps soient non mobiles sur le substrat pourrait être perçu comme un biais dans nos expériences. En effet, cette approche diffère des techniques employées dans les travaux pionniers de Michael Dustin et d'autres par la suite qui ont montré des mouvements des microclusters (pCMH/TCR ou ICAM-1/LFA-1) de la périphérie vers le centre de la synapse sur des bicouches lipidiques. En effet, les ligands du TCR et des intégrines introduits dans cette membrane artificielle diffusent librement dans la bicouche (Grakoui et al., 1999). Ces observations sont par ailleurs confirmées dans un modèle de synapse formée avec une CPAg (Monks et al., 1998). Cependant, il a été démontré que les ligands de la membrane de la CPAg ne diffusent pas non plus librement du fait de leur attachement au cytosquelette d'actine (Comrie et al., 2015b). Par ailleurs, dans nos expériences, la quantification du nombre et de la densité de

microclusters requiert que ces microclusters soient individualisés sur un nombre significatif de cellules. Notre modèle d'activation pourrait se rapprocher d'avantage d'une synapse multifocale décrite entre des lymphocytes T et des cellules dendritiques (Brossard et al., 2005).

D'une manière générale, les modèles d'activation utilisant des anticorps anti-CD3 ϵ /anti-CD28 sont différents d'une activation induite par le pCMH à la synapse immunologique. Ils ont cependant eu l'avantage de contrôler les types des molécules engagées et de nous permettre d'interpréter les résultats observés sur le recrutement de LAT en absence de VAMP7, Rab6 ou IFT20 comme des défauts dépendants de la signalisation en aval du TCR/CD28 et non d'autres molécules associées à la signalisation T.

4.1.2.2. L'activation avec des cellules présentatrices d'antigène

Comme je l'ai souligné dans la partie précédente, la simplification du système d'observation par l'utilisation d'anticorps activateurs peut être un avantage mais peut également présenter des inconvénients car les interprétations faites dans de tels systèmes peuvent ne pas avoir de relevance physiologique. En effet, l'utilisation d'anticorps activateurs ne peut résumer ni l'engagement d'autres molécules participant à la signalisation et qui peuvent moduler la réponse lymphocytaire T comme LFA-1 (Varga et al., 2010), ni d'autres aspects des cellules présentatrices d'antigène comme leur rigidité (Bufi et al., 2015; Hivroz and Saitakis, 2016). C'est la raison pour laquelle, nous avons essayé dans la mesure du possible de comparer les résultats obtenus avec des anticorps activateurs dans des systèmes de présentation d'antigène.

La signalisation dans les cellules T Jurkat a ainsi été analysée en présence de cellules B Raji et de superantigène SEE. Nous avons pu observer les mêmes différences de phosphorylation de LAT en absence de VAMP7 avec des anticorps activateurs ou avec les cellules B Raji, suggérant que les deux modèles sont valides pour cette analyse. Dans la mesure où la réponse tardive (sécrétion d'IL-2) des cellules

T Jurkat n'est pas induite avec des anticorps activateurs, l'activation avec des cellules B Raji en présence de superantigène a constitué le principal modèle pour nos tests fonctionnels dans les cellules T Jurkat. Les superantigènes qui se lient directement aux CMH-II des CPAg sont capables d'engager différents segments V β (H. Li et al., 1999; Llewelyn et al., 2006). Ainsi, le SEE qui interagit avec le segment V β 8 a constitué un modèle d'antigène très utile dans l'activation des cellules T Jurkat qui sont par définition des cellules monoclonales (pour le TCR) et qui expriment le TCR V β 8. Si l'ensemble des cellules T Jurkat en contact avec des cellules B Raji pulsées avec du SEE sont donc engagées, les blastes T primaires humains qui sont polyclonaux doivent être réactivés avec des cellules dendritiques dérivés du sang en présence d'un cocktail de superantigènes (SEE, SEB, TSST-1) afin de couvrir une proportion suffisante (moins de la moitié) des T activées. Les défauts de sécrétion d'IL-2 dans les cellules déficientes pour VAMP7 ont d'ailleurs pu être confirmés dans ce modèle plus physiologique de lymphocytes T primaires humains. Enfin, nous avons utilisé un troisième modèle d'activation de lymphocytes T de souris exprimant un TCR transgénique OT-II. Ce système qui est également monoclonal a constitué dans nos études un outil particulièrement intéressant pour l'analyse de la réponse tardive des lymphocytes T mais aussi de la formation de la synapse par des lymphocytes T déficients pour IFT20 ou pour VAMP7. Toutefois, lorsque nous avons voulu réaliser des tests fonctionnels d'activation dans un système antigénique avec la lignée Rab6 cKO, la lignée OT-II n'était pas encore disponible. Nous avons ainsi activé les cellules T déficientes pour Rab6 dans un système allogénique (MLR) où les cellules présentatrices issues de souris génétiquement différentes (fonds génétique BALB/c) ont été utilisées comme cellules stimulatrices. Ce modèle d'activation demande un protocole plus contraignant dans la mesure où le nombre de T répondant aux pCMH allogéniques est faible. Nous avons donc choisi dans ce modèle d'analyser la prolifération des lymphocytes T par mesure de l'accumulation des cellules qui sont entrées en division. Le modèle de MLR est par ailleurs, un système relativement proche des conditions physiologiques car les cellules répondent à une gamme de

peptides antigéniques de différentes affinités, ce qui n'est pas le cas lorsque les modèles transgéniques du TCR (OT-I et OT-II) sont utilisés.

4.1.2.3. Explications proposées pour les différences de résultats entre les modèles antigéniques et non antigéniques

Une différence majeure a pu être constatée entre les modèles d'activation avec des anticorps activateurs ou avec des CPAg. En effet, en absence de VAMP7 ou de Rab6, nous n'avons pas noté de défauts de la réponse tardive (prolifération et production de cytokines) lorsque les lymphocytes T de souris ont été activés avec des anticorps activateurs alors que des défauts importants de prolifération des cellules ont été observés dans un contexte antigénique (**Fig.3.2.11,12**). Cela paraissait surprenant dans la mesure où des défauts très précoces de signalisation ou de recrutement de LAT à la synapse immunologique ont été observés avec des anticorps activateurs.

Il est intéressant de noter que des observations similaires ont pu être faites dans d'autres études. Notamment, les souris invalidées pour THEMIS ne présentent pas de défauts majeurs d'activation (flux calcique et phosphorylation de PLC γ 1) lorsque celles-ci sont activées avec des anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD4 qui présentent des affinités élevées pour leur ligand (Fu et al., 2013b; 2009). Les défauts liés à l'absence de THEMIS n'ont ainsi été révélés chez la souris que lorsque les cellules (des thymocytes OT-I) ont été stimulées avec des peptides OVA de classe-I mutés de faibles affinités (Fu et al., 2013b). En lien avec notre problématique, il a par ailleurs été suggéré par le groupe de Gillian Griffiths que la force du TCR pour le pCMH puisse aussi moduler le transport intracellulaire des granules cytolytiques à la synapse (Jenkins et al., 2009). Nous suspectons ainsi que les défauts de réponse T tardives dans les lymphocytes T CD4⁺ VAMP7 KO ou bien Rab6 cKO activés soient masqués par la force de la signalisation induite par le « crosslinking » du TCR avec des anticorps activateurs. Le fait que les réponses des lymphocytes T OT-II VAMP7 KO ne soient altérées qu'aux faibles concentrations de peptide OVA appuie cette hypothèse. Nous nous proposons de tester cette hypothèse dont je reparlerai en perspectives.

4.1.3. L'imagerie photonique

4.1.3.1. *Les analyses de colocalisation*

L'imagerie des lymphocytes T a constitué une part importante du travail que nous avons effectué dans ces différentes études. Cela a constitué une tâche particulièrement ardue dans la mesure où ces cellules sont de petites tailles et présentent un cytoplasme peu volumineux. Ainsi, la résolution dans un espace si confiné est beaucoup plus faible que pour d'autres types cellulaires comme des cellules HeLa pour lesquelles le ratio des volumes cytoplasme/noyau est beaucoup plus important que dans les cellules T et dont les compartiments intracellulaires sont relativement « éclatés ». Ce problème de taille est particulièrement prégnant pour les lymphocytes T primaires de souris et c'est la raison pour laquelle j'ai préféré travailler sur des cellules humaines (Jurkat) notamment pour les expériences de co-localisation.

Les analyses de la localisation de LAT dans les lymphocytes T Jurkat se sont révélées importantes afin d'obtenir un « état des lieux » de la distribution de LAT dans les cellules T au repos. Nous avons ainsi pu définir que LAT est présent dans des compartiments endosomaux Rab11⁺. Ces observations avaient d'abord été faites par sur-expression de Rab11-GFP. La sur-expression de certaines protéines peut altérer leur localisation, c'est pourquoi nous avons confirmé ces résultats par l'analyse de la forme endogène de Rab11 et cela a été fait dans la mesure du possible avec les marqueurs intracellulaires analysés. De plus, la localisation endosomale de LAT a également été confirmée à l'aide du marqueur des endosomes précoces Rab5. Cela est en accord avec les observations faites dans d'autres études montrant notamment une localisation de la fraction intracellulaire de LAT dans des compartiments TfR⁺ (Bonello et al., 2004). Nos analyses n'ont cependant pas montré de rôle fonctionnel majeur de Rab11 dans le transport de LAT à la synapse immunologique ou dans les cellules au repos. Néanmoins, nous avons observé que l'absence de Rab11 altère principalement le transport de p56^{Lck}, comme décrit dans d'autres travaux (Gorska et al., 2009; Gorska and Alam, 2012). Cela est également en accord avec les travaux du

laboratoire d'Andrés Alcover ayant montré que LAT et p56^{Lck} sont transportés par des voies indépendantes. Par ailleurs, des analyses préliminaires de la fonction de VAMP3, une protéine v-SNARE caractérisée pour sa fonction au niveau des endosomes de recyclage (Daro et al., 1996; McMahon et al., 1993) et qui colocalise également avec LAT jouerait un rôle dans son transport vers ou depuis les endosomes de recyclage (non montré). Cela appuie la colocalisation de LAT avec Rab11 mais indique également que les analyses de colocalisation doivent être interprétées rigoureusement. Notamment, la colocalisation entre deux protéines ne signifie pas nécessairement qu'elles soient liées fonctionnellement. Nous avons aussi pu noter, qu'à l'inverse, l'absence de colocalisation entre deux marqueurs ne signifie pas qu'un lien fonctionnel n'existe pas. Au début de ma thèse, j'avais d'ailleurs choisi d'écartier la petite GTPase Rab21 comme candidat potentiel dans le transport de LAT, parce que les deux protéines analysées par microscopie confocale n'étaient pas dans des compartiments proches à la synapse immunologique. L'analyse d'un mutant de la GEF VARP (Δ Vps9) incapable de se lier à Rab21, a montré des défauts de transport de LAT à la synapse immunologique, suggérant que Rab21 joue un rôle à un moment donné du trafic intracellulaire de LAT. Enfin, notre étude sur le rôle de Rab6 dans le transport de LAT, mais aussi d'autres études publiées notamment sur la maturation des granules cytotoxiques avant leur sécrétion (Ménager et al., 2007) révèlent également que dans un système très dynamique de trafic intracellulaire une faible colocalisation entre deux protéines ne signe pas forcément l'absence de lien fonctionnel dans leur trafic.

4.1.3.2. La quantification d'images

L'analyse des images acquises par microscopie a constitué une étape importante de notre travail. Ce travail s'est révélé parfois fastidieux dans la mesure où nous avons cherché à quantifier des nombres significatifs de cellules pour chacune de nos conditions. Afin d'accélérer nos analyses mais aussi afin d'obtenir des quantifications rigoureuses et de limiter les biais liés à l'expérimentateur, nous avons

développé des outils de quantification d'images automatiques ou semi-automatiques. Notamment, un set de scripts compatibles avec Fiji a permis d'analyser l'enrichissement de molécules à la synapse immunologique dans des « cellules moyennes » normalisées en taille mais aussi en fluorescence permettant de comparer de manière rigoureuse différentes conditions. Ces analyses mènent à différents types de représentations comme les cellules moyennes, les profils moyens d'intensité de fluorescences ou encore les pourcentages d'enrichissement cellules/cellules. Ces représentations sont à mon sens plus appropriées que le choix de cellules représentatives qui peuvent parfois être biaisées.

4.2. Critiques et perspectives sur les résultats obtenus

4.2.1. La voie de transport exocytique de LAT vers la synapse immunologique ou le rôle de VAMP7 dans le transport de LAT

4.2.1.1. *Rappel succinct des résultats*

La protéine v-SNARE VAMP7 est une protéine de fusion membranaire impliquée dans la sécrétion de cargos post-golgiens à la synapse neuronale (Burgo et al., 2012) mais aussi dans la sécrétion de compartiments tardifs les granules cytolytiques des cellules NK (Krzewski et al., 2011) ou au moins indirectement dans la sécrétion des mélanosomes (Dennis et al., 2016). Nous avons observé par microscopie TIRF que VAMP7 et LAT sont co-recrutées dans des vésicules à la synapse immunologique. Par l'utilisation de différents modèles de lymphocytes T analysés par microscopie confocale, par microscopie TIRF ou encore par l'analyse du signalosome TCR/CD28, nous avons montré que le transport de LAT aux sites d'activation du TCR est déficient en absence de VAMP7. Ces défauts de transport de LAT à la synapse immunologique sont associés à des défauts de phosphorylation de LAT, et à des défauts de réponse tardive des lymphocytes T (sécrétion de cytokines, prolifération, expression de marqueurs d'activation).

Ainsi, nos résultats ont démontré pour la première fois un lien fonctionnel entre le transport de la fraction intracellulaire de LAT, la phosphorylation de cet adaptateur et l'activation lymphocytaire T. La confirmation de la présence de VAMP7 dans les vésicules LAT recrutées à la synapse immunologique suggère que VAMP7 participe directement au transport des vésicules LAT à la synapse immunologique.

Je souhaiterais commenter dans cette partie certains résultats qui nous ont interpellés. Basé sur nos observations et sur les connaissances des voies de transport régulées par VAMP7, je proposerai plusieurs modèles du recrutement de LAT à la synapse immunologique.

4.2.1.2. Implication de VAMP7 dans la signalisation précoce ou pourquoi une signalisation existe lorsque le signalosome est altéré ?

Nous avons analysé la signalisation en absence de VAMP7 dans les cellules T Jurkat ou de souris et avons observé un défaut de phosphorylation de la tyrosine Y191 de LAT après engagement du TCR avec des anticorps activateurs anti-CD3 ϵ /anti-CD28. Bien que ce résidu tyrosine soit principalement requis pour le recrutement au signalosome LAT et la phosphorylation de PLC γ 1 et SLP-76, une analyse non exhaustive de la signalisation lymphocytaire T a montré que les phosphorylations de PLC γ 1 et SLP-76 ne sont pas diminuées en absence de VAMP7 alors que la phosphorylation de ERK1/2 est altérée. Cette observation est particulièrement surprenante dans la mesure où les recrutements de PLC γ 1, et SLP76 au signalosome étaient déficients en absence de VAMP7. Il est à noter que nous avons également observé une signalisation calcique normale mesurée par cytométrie en flux dans les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ issus des souris VAMP7 KO ou Rab6 cKO corroborant les observations de la phosphorylation de PLC γ 1 dans les cellules humaines.

Plusieurs hypothèses non exclusives que nous n'avons pas testées peuvent être envisagées.

Signalisation indépendante de LAT en absence de VAMP7 ?

La phosphorylation des molécules de PLC γ 1 et SLP-76 est compensée par une voie de signalisation indépendante ou partiellement indépendante de LAT. Il a en effet été montré par le groupe de Gary Koretzky que SLP-76 peut reconstituer une signalisation médiée par NF-AT en absence de LAT lorsque la localisation de cette protéine est ciblée dans les « rafts lipidiques » (Boerth et al., 2000), suggérant que dans ces conditions, la signalisation calcique est également reconstituée. Il peut ainsi être envisagé que SLP-76 soit tout de même capable de participer à la signalisation par son recrutement dans des îlots membranaires propices à sa phosphorylation, bien que la phosphorylation de LAT^{Y191} soit diminuée en absence de VAMP7. Toutefois,

ces compensations ne sont pas observées dans les cellules T Jurkat déficientes pour LAT (JCaM2) (W. Zhang et al., 2000) suggérant que cette hypothèse n'explique pas à elle seule le phénotype que nous observons en absence de VAMP7.

Contribution de la fraction de LAT à la membrane plasmique ?

L'expression de LAT à la membrane plasmique en absence de VAMP7, mesurée par marquage extracellulaire de la molécule chimérique HA-LAT (non montré, analyses réalisées par une ancienne post-doctorante du laboratoire, Paola Larghi), n'a pas montré de défaut. Il paraît ainsi envisageable que cette fraction de LAT puisse contribuer à la signalisation dès les premières secondes après l'engagement du TCR. Cela coïnciderait avec les délais de mobilisation du calcium qui apparaît au cours des 10 premières secondes suivant l'ajout d'anticorps activateurs (Cerveira et al., 2015). Nos observations ainsi que celles faites dans la littérature (Bonello et al., 2004) suggèrent que LAT est présente dans des compartiments péricentriolaires qui sont recrutés à la synapse immunologique avec le centrosome. Ce recrutement du MTOC à la synapse immunologique se compte en minutes (5-7minutes) (Blanchard et al., 2002) et ne coïncide pas avec le timing de la signalisation calcique. Nous pouvons ainsi envisager un modèle où la fraction de LAT à la membrane plasmique est mise en jeu dans les premières secondes après l'engagement du TCR et conduit à une signalisation très précoces. Cela est notamment en accord avec les observations de l'équipe de Lawrence E. Samelson qui décrit une phosphorylation robuste de LAT à ces temps précoces (jusqu'à 2 minutes) et avec les travaux de Mark M. Davis qui proposent que les îlots de TCR et de LAT à la membrane plasmique se rencontrent lors de l'activation précoce (Lillemeier et al., 2010).

Ainsi, nous pouvons imaginer un modèle dans lequel la fraction de LAT à la membrane plasmique induirait une signalisation médiée par PLC γ 1 et pourrait ainsi contribuer à l'accumulation de DAG à la synapse et au recrutement du MTOC. Cela serait nécessaire au recrutement de la fraction péricentriolaire de LAT qui signaliserait sous formes vésiculaires (Larghi et al., 2013; Martín-Cófreces et al., 2012; Williamson

et al., 2011; Yudushkin and Vale, 2010), ou bien après fusion de ces compartiments à la membrane plasmique (Soares et al., 2013a). Dans un tel modèle, une phosphorylation robuste de ERK1/2 serait particulièrement dépendante de la fraction intracellulaire de LAT. Notamment, Ras/MAPK est capable d'induire une réponse cellulaire digitale (tout ou rien) mais aussi une réponse analogue, c'est à dire de manière graduée selon l'intensité du stimulus (Harding and Hancock, 2008). Dans cette ligne de raisonnement, nous pouvons poser l'hypothèse selon laquelle la voie MAPK serait donc sensible au quantum de signalisation induit par le recrutement de la fraction intracellulaire de LAT transportée à la synapse immunologique. En absence de VAMP7, la réduction de ce quantum serait ainsi ressentie sous la forme d'une réduction de la phosphorylation de ERK1/2 et de la réponse tardive T en aval (production de cytokines, prolifération).

Cette hypothèse selon laquelle les fractions de LAT contribuent différemment à la signalisation n'est pas aisée à tester du fait de la difficulté à discriminer ces deux pools. La signalisation T en absence de VAMP7 à des temps plus précoces (< 2minutes) serait intéressante à analyser mais il serait surtout particulièrement informatif d'analyser la signalisation T en inhibant le recrutement du MTOC à la synapse sans toutefois altérer la signalisation médiée par le TCR ou p56^{Lck}. L'expression dans des cellules Jurkat ou JCaM2 d'une forme tronquée de LAT ne possédant pas de queue cytoplasmique (LAT^{ΔCt}) pourrait être un élément en faveur de cette hypothèse (Bonello et al., 2004). En effet, il a été observé dans ces conditions que la fraction péricentriolaire de LAT n'est pas recrutée à la synapse immunologique, ce qui pourrait être interprété comme un défaut initial de signalisation et de recrutement du MTOC.

Ainsi, les observations d'une signalisation partiellement altérée malgré le déficit de phosphorylation de LAT en absence de VAMP7 se révèlent informatives. Cela appuie l'idée que la signalisation lymphocytaire (mais cela est vrai pour la signalisation cellulaire d'une manière générale) n'est pas linéaire. En effet, le trafic intracellulaire en lui-même rend la signalisation dynamique et probablement versatile. De plus, cela

démontre également que la signalisation dépendante du TCR est probablement modulaire. Les données de la littérature proposent en effet que plusieurs signalosomes LAT co-existent et/ou se succèdent dans le temps. L'hypothèse d'une signalisation LAT se faisant en deux temps et contribuant de manière différente à la signalisation irait dans ce sens. Cependant, les approches expérimentales employées présentent bien souvent une vue générale de l'état de phosphorylation d'une molécule en réponse à la localisation ou bien l'état général des interactions établies par les molécules de signalisation (Au-Yeung et al., 2014; Roncagalli et al., 2014). Elles reflètent cependant très difficilement l'importance de la constitution des signalosomes individuels ou de leur succession dans le temps. Les analyses par microscopie super-résolutive (PALM/STORM), bien qu'ayant également leurs limites en termes d'interprétations fonctionnelles des observations, suggèrent cette organisation modulaire de la signalisation notamment sous la forme de nanoterritoires de signalisation interconnectés (Purbhoo et al., 2010; Soares et al., 2013a).

4.2.1.3. Modèles proposés pour le transport de LAT à la synapse immunologique.

Bien que le recrutement de la fraction intracellulaire de LAT à la synapse immunologique et son rôle dans la signalisation T ont été controversés (Balagopalan et al., 2013), il est aujourd'hui admis par l'ensemble de la communauté (communication orale donnée par Lawrence E. Samelson à l'occasion d'une conférence EMBO, Sienne, 2016) que le trafic intracellulaire de LAT est nécessaire à la réponse lymphocytaire T. La mise en évidence d'un acteur moléculaire, VAMP7, dans le transport de LAT constitue une avancée importante dans la compréhension de la régulation de la signalisation T et permet de poser plusieurs modèles de transport intracellulaire de LAT à la synapse immunologique.

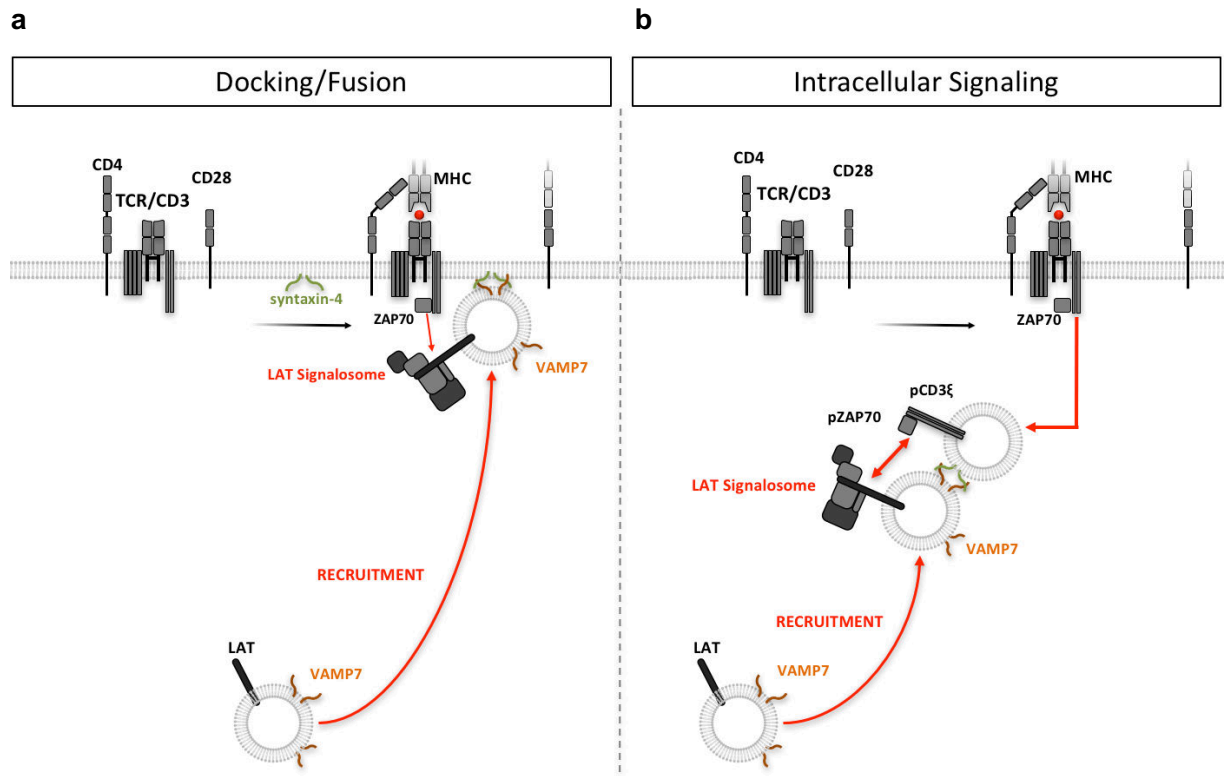


Figure 4.2.1. Modèles pour la fonction de VAMP7 dans l'arrimage/fusion des cargos LAT aux sites d'activation du TCR.

(a) VAMP7 est impliquée dans l'arrimage/fusion des cargos LAT à la membrane plasmique de la synapse immunologique. Cela est également proposé par le groupe d'Andrés Alcóver qui a montré que la synaptotagmine-7, molécule partenaire de VAMP7, est impliquée dans la fusion des vésicules LAT à la synapse immunologique (Soares et al., 2013a). (b) VAMP7 est impliquée dans l'arrimage/fusion des vésicules LAT avec les vésicules endocytiques phospho-CD3 ζ . Cette hypothèse est en accord avec les observations de F. Sanchez-Madrid et R.D. Vale qui proposent qu'une fraction de phospho-CD3 ζ est endocytique et que ces vésicules interagissent avec des vésicules contenant LAT (Martín-Cófreces et al., 2012; Yudushkin and Vale, 2010). (a-b) L'arrimage/fusion pourrait être médié par l'interaction de VAMP7 avec la t-SNARE syntaxine-4.

Rôle de VAMP7 dans l'arrimage/fusion des vésicules LAT aux sites d'activation du TCR

VAMP7 est une molécule v-SNARE participant à l'exocytose de divers cargos à la membrane plasmique. Cette v-SNARE pourrait ainsi participer à l'arrimage/fusion des vésicules LAT à la synapse immunologique (**figure 4.2.1a**). Alternativement, il a été proposé par les groupes de Ronald Vale et Francesco Sanchez-Madrid, qu'une signalisation intracellulaire se produit après l'engagement du TCR et que les vésicules CD3 ζ interagissent étroitement avec des vésicules LAT (Martín-Cófreces et al., 2012; Yudushkin and Vale, 2010). Ainsi, il peut également être proposé que VAMP7 contribue à l'interaction entre ces vésicules pour la propagation voire la diversification du signal provenant du TCR (signalisation calcique à la membrane plasmique versus signalisation Ras intracellulaire ?) du signal provenant du TCR (**figure 4.2.1b**). Plusieurs partenaires potentiels de VAMP7 peuvent être envisagés dans les mécanismes de recrutement de LAT. Nous avons pu constater qu'une t-SNARE partenaire de VAMP7, la syntaxine-4 (Rao et al., 2004b), est enrichie au signalosome TCR/CD28 suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans l'arrimage/fusion des vésicules LAT aux sites d'activation du TCR. Par ailleurs, le groupe d'Andrés Alcover a montré que la synaptotagmine-7, qui est un senseur de calcium impliqué dans la fusion membranaire dépendante de VAMP7 (Arantes and Andrews, 2006), joue un rôle dans le recrutement de LAT à la périphérie des cellules traitées avec de la thapsigargine.

Autres rôles de VAMP7 envisageables dans le trafic de LAT ?

Les résultats présentés dans ce manuscrit montrent une diminution du recrutement de LAT à la synapse immunologique en absence de VAMP7. Cependant, dans l'hypothèse où VAMP7 est impliquée dans l'arrimage/fusion des vésicules LAT à la synapse immunologique, nous aurions pu nous attendre à une accumulation des microclusters LAT à la zone synaptique. C'est d'ailleurs l'observation que nous faisons lorsque le clivage de certaines v-SNAREs est induit par l'activité protéolytique de la neurotoxine tétanique. Cette légère accumulation des microclusters LAT à la synapse

suggère qu'une fusion des vésicules LAT pourrait être médiée par cette famille de v-SNAREs sensibles à la toxine. Par ailleurs, nos analyses par microscopie ont montré qu'en absence de VAMP7, LAT est retenue dans des compartiments intracellulaires. Dans cette ligne de raisonnement, nous nous proposons donc que VAMP7 joue un rôle dans des étapes de transport plus en amont de l'arrimage/fusion terminale des vésicules exocytiques LAT à la synapse immune.

L'activité fusogénique de VAMP7 mais aussi sa localisation sont étroitement liées à la fonction de VARP dont nous avons montré le rôle dans le recrutement de LAT à la synapse immune. VAMP7 et VARP sont impliquées dans différentes voies de transport notamment par leur interaction avec Rab21 ou Rab32/38. Ainsi, plusieurs mécanismes de transport des cargos LAT peuvent être envisagés (**figure 4.2.2**) : *i.* la sécrétion de LAT depuis des compartiments tardifs (lysosomes, MVB), *ii.* la sécrétion de LAT depuis les endosomes vers la synapse immunologique, *iii.* la sécrétion de LAT via l'appareil de Golgi/TGN.

i. La sécrétion de LAT depuis des compartiments tardifs à la synapse

Des analyses réalisées par immunofluorescence ont montré une colocalisation de LAT avec Rab27 dans les cellules au repos (Soares et al., 2013a), ou Rab7 dans les cellules activées (Purbhoo et al., 2010). Ces deux petites GTPases sont impliquées dans le transport associé aux compartiments tardifs de types lysosomaux ou bien MVB (« multivesicular bodies »). Ceci peut être mis en parallèle avec les rôles proposés de VAMP7 dans la régulation de la fusion de compartiments tardifs comme les mélanosomes (Dennis et al., 2016), les granules cytotoxiques (Krzewski et al., 2011) ou encore des MVB (Fader et al., 2009) à la membrane plasmique de différents types cellulaires. Dans les mélanocytes, il est proposé que la régulation de la biogénèse des mélanosomes impliquerait un complexe associant VAMP7, VARP et les petites GTPases Rab32/Rab38 (Fukuda, 2016). Nos résultats et ceux de la littérature montrent un recrutement des compartiments tardifs LAMP1⁺ à la synapse immunologique et nous pourrions envisager que LAT soit transportée *via* des compartiments tardifs de manière dépendante de VAMP7/VARP. Cependant, aucune

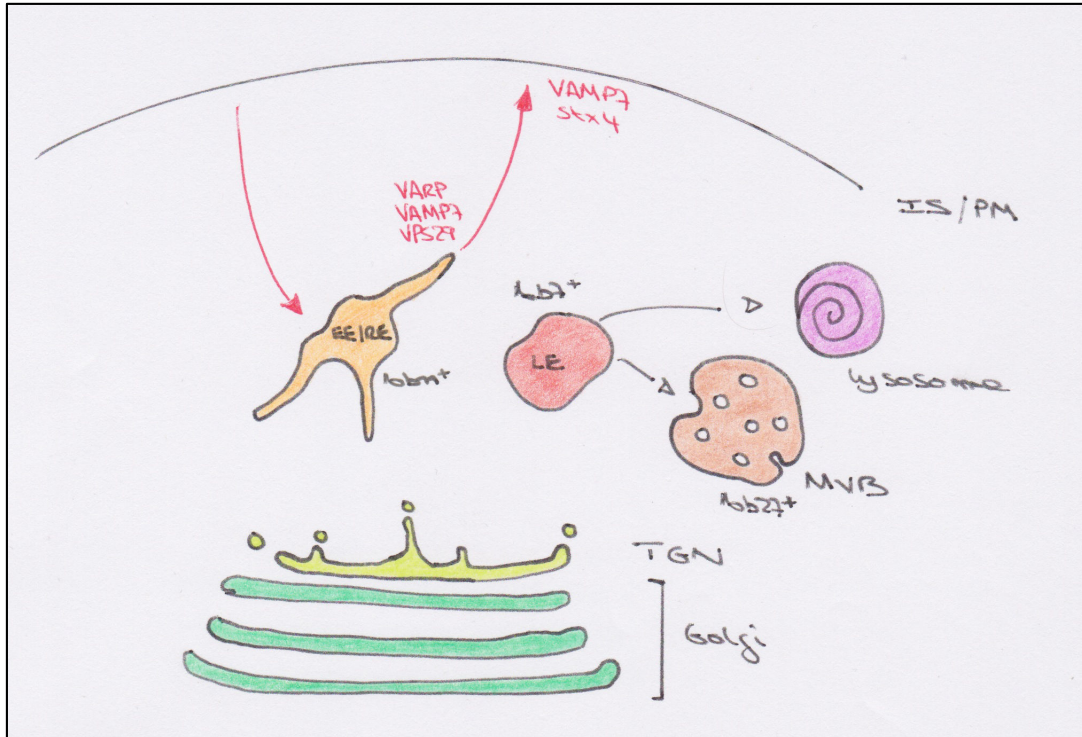
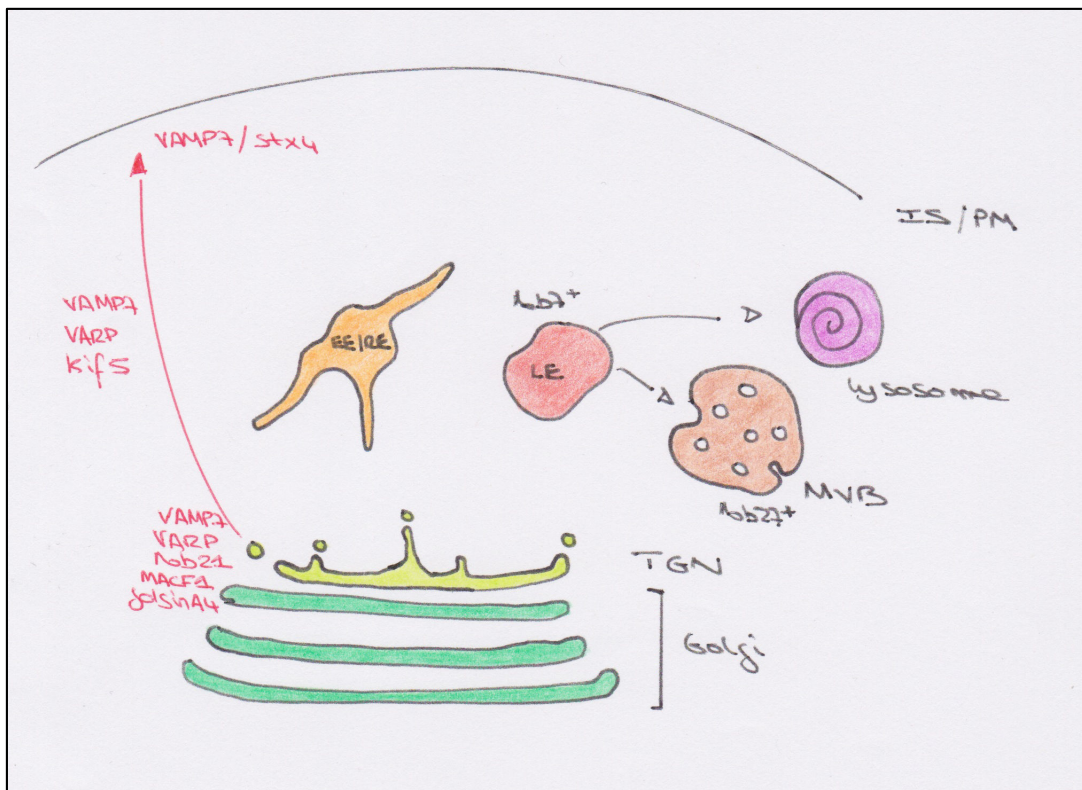
a**b**

Figure 4.2.2. Modèles pour la fonction de VAMP7 dans le trafic intracellulaire de LAT vers la synapse immunologique.

(a) LAT est transporté depuis les endosomes précoces (EE) ou de recyclage (RE) vers la synapse immunologique (IS) à l'aide d'un complexe VARP/Rab21/VAMP7/Vps29 (Hesketh et al., 2014). (b) Les cargos LAT émergent du TGN grâce au complexe moléculaire VAMP7/VARP/Rab21/MACF1/golgin-A4. Le transport de ces cargos vers la synapse immunologique serait dépendant des microtubules et du complexe VARP/VAMP7/Kif5 (Burgo et al., 2012). Une fois à la synapse immunitaire, l'arrimage/fusion des cargos LAT aux sites d'activation du TCR nécessiterait le complexe SNARE VAMP7/syntaxine-4. MVB, Multivesicular Bodies ; LE, Late Endosomes ; IS, Synapse Immunologique.

colocalisation convaincante dans nos cellules T Jurkat n'a pu être mise en évidence entre LAT et LAMP1 ou LAT et Rab27 (non montré) alors que LAT et VAMP7 sont co-transportées dans les mêmes vésicules exocytiques. Nous n'avons donc pas favorisé cette hypothèse mais l'interférence avec les petites GTPases Rab32/Rab38 dans la régulation du transport *via* ces compartiments pourrait permettre de vérifier cette idée. Par ailleurs, l'analyse de la dégranulation lysosomale dans les lymphocytes T CD8⁺ issus des souris VAMP7 KO, en collaboration avec le groupe de Geneviève de Saint Basile (expériences réalisées par F.Sepulveda), n'ont pas permis de montrer de rôle de VAMP7 dans ce transport. Cela pourrait suggérer que dans les lymphocytes T la fonction de VAMP7 n'est pas privilégiée dans cette voie.

ii. La sécrétion depuis les endosomes vers la synapse immune

Nous avons montré par des expériences de colocalisations mais aussi par un suivi du transport depuis la membrane plasmique que LAT est internalisée et transportée *via* des endosomes Rab11⁺. La re-sécrétion de LAT à la synapse immunologique depuis ces endosomes est une hypothèse que nous avons fortement envisagée (**figure 4.2.2a**). Notamment, VARP et VAMP7 coopèrent avec certains composants du rétromère (Vps29) dans le transport de certains cargos comme le transporteur de glucose GLUT1 (Hesketh et al., 2014) depuis les endosomes vers la membrane plasmique. Par ailleurs, certaines données suggèrent que VAMP7 est impliquée dans le recyclage constitutif de GLUT4 (Randhawa et al., 2004) qui dépend aussi de la petite GTPase Rab11 (Randhawa et al., 2004; Uhlig et al., 2005). L'interférence avec l'expression de Rab11 dans les cellules T Jurkat n'a révélé de rôle majeur de cette petite GTPase dans le recrutement de LAT à la synapse immunologique. Cela suggère que d'autres partenaires du transport depuis les endosomes seraient nécessaires ou bien que LAT emprunterait une voie différente.

iii. La sécrétion de LAT depuis le TGN vers la synapse immune

Il a été mis en évidence dans les neurones que la fonction de VAMP7 et de VARP sont également associées à la petite GTPase Rab21 (Burgo et al., 2012; 2009).

Les fonctions de Rab21 dans l'internalisation et le transport endocytaire de certains cargos comme l'intégrine $\beta 1$ (Mai et al., 2011) ou bien du récepteur à l'EGF (X. Yang et al., 2012) ont été proposées. Rab21 est également impliquée dans le transport de vésicules exocytiques depuis l'appareil de Golgi dépendamment de sa GEF VARP et de VAMP7 (Burgo et al., 2012) (**figure 4.2.2b**). Nos analyses de la fonction du mutant VARP ^{Δ Vps9} qui ne peut pas interagir avec Rab21 mais capable d'assurer ses fonctions associées à Rab32/38 nous permettent de proposer que le transport de LAT dépende de Rab21 et d'un transport post-golgien. Par ailleurs, nos analyses montrent une proportion non négligeable (environ 50% par microscopie confocale) du marquage VAMP7 dans l'appareil de Golgi et notamment le TGN (compartiment syntaxine-16⁺). ce qui suggère que VAMP7 transporte la fraction intracellulaire de LAT depuis le TGN.

Enfin, le transport post-golgien des cargos VAMP7 dépendant de VARP implique la chaîne lourde Kif5A de la kinésine-1 dans les neurones (Burgo et al., 2012). Kif5A n'est pas exprimée dans les lymphocytes T alors que l'isoforme Kif5B est exprimé. Cependant, les analyses du transport de LAT à la synapse immunologique et de la réponse (production de cytokines, prolifération) des lymphocytes T CD4⁺ issus des souris Kif5B cKO (en collaboration avec l'équipe de Geneviève de Saint Basile, Gaël Ménashé et Isabelle Munoz), n'ont pas montré de défauts majeurs, suggérant que si LAT emprunte cette voie exocytique, un autre moteur moléculaire serait impliqué dans ce transport.

iv. L'emploi de la machinerie de cillio-génèse pour le transport de LAT ?

La synapse immunologique présente les caractéristiques d'un site de formation frustrée d'un cil primaire (Stinchcombe et al., 2015; Stinchcombe and Griffiths, 2014). En effet, les groupes de Cosima T. Baldari et de Gillian Giffith ont montré que plusieurs partenaires de la machinerie de formation du cil primaire sont impliqués dans le transport de différents cargos à la synapse immunologique formée par des lymphocytes T CD4⁺ ou des CTLs (Finetti et al., 2009; la Roche et al., 2013). Le rôle

de VAMP7 dans la formation du cil primaire a été démontré dans une lignée cellulaire d'épithélium rénal MDCK (Szalinski et al., 2014). En effet, la longueur des cils primaires formés est réduite dans des cellules dont l'expression de VAMP7 a été éteinte. La formation des cystes rénaux, qui dépendent d'une croissance normale des cils primaires, est ainsi très fortement altérée. Les auteurs de cette étude suggèrent que VAMP7 jouerait un rôle important dans la machinerie de cillio-génèse. Nous pouvons émettre l'hypothèse que LAT pourrait être transportée par cette machinerie à l'instar d'autres molécules de signalisation comme certaines molécules de la voie hedgehog (la Roche et al., 2016; 2013).

IFT20 est une protéine de transport intraflagellaire qui est localisée dans le golgi mais joue également un rôle important dans la formation du cil primaire (Follit et al., 2006). Nous avons analysé le rôle de la protéine IFT20 dans la signalisation et la réponse lymphocytaire T chez la souris. Ce travail qui a été réalisé en collaboration avec les équipes de Cosima T. Baldari et Sebastian Amigorena a permis de montrer qu'en absence d'IFT20, la réponse lymphocytaire T (prolifération, sécrétion/production de cytokines) est déficiente. L'analyse d'évènements plus précoces de l'activation lymphocytaire comme le remaniement du cytosquelette d'actine par la mesure de l'étalement des cellules sur un substrat activateur ou bien la polarisation du MTOC à la synapse n'ont pas montré de défaut. Cela suggère qu'à l'instar de VAMP7, les évènements de signalisation précoces ne sont que partiellement altérés. En absence d'IFT20, nous avons noté un défaut du recrutement de LAT à la synapse immunologique, ce qui suggère que LAT emprunte effectivement une voie de transport intraflagellaire, comme le prédit la fonction de VAMP7 dans les cellules épithéliales de rein. Cependant, les résultats montrant un défaut de phosphorylation de ZAP-70 à la synapse immunologique formée par des lymphocytes T CD4 IFT20 cKO suggèrent qu'IFT20 contrôle le transport de molécules « en amont » de LAT. Ces effets en amont pourraient être attribués à un défaut de transport du TCR dont le recrutement à la synapse nécessite les protéines IFT dont IFT20 (Finetti et al., 2014; 2009). Cela me pousse donc à moduler l'hypothèse d'un effet direct d'IFT20 sur le transport et l'activation de LAT. Cependant, comme le propose le groupe d'Andrés Alcover, on ne

peut exclure que LAT soit co-transportée avec le TCR (discuté en **partie 4.2.2.3**). Nous avons d'ailleurs pu remarquer que l'absence d'IFT20 dans les lymphocytes T induit des effets plus importants sur la réponse T (prolifération) que l'absence de VAMP7 ou Rab6. Cela suggère qu'IFT20 pourrait en effet transporter un autre cargo que LAT. Des analyses plus poussées sont donc nécessaires afin de mettre en évidence un lien direct entre la fonction d'IFT20 et le transport de LAT. Notamment, des analyses de la présence d'IFT20 dans les cargos exocytiques LAT pourraient permettre d'établir ce lien.

4.2.2. Rab6 et la voie rétrograde de LAT

4.2.2.1. Rappel succinct des résultats

Les résultats apportés par l'analyse du rôle de VAMP7 dans le recrutement de LAT à la synapse immunologique nous ont permis de poser plusieurs hypothèses (**Fig.4.2.2**) sur les voies impliquées dans ce transport. Notamment, certaines de ces données suggéraient plusieurs liens entre le transport endocytique de LAT et l'appareil de Golgi. La petite GTPase Rab6 est localisée entre autres au TGN et présente des fonctions au carrefour entre les endosomes et les vésicules post-golgiennes. A l'aide de différents modèles déficients pour Rab6 (*a/a'*), nous avons montré que cette petite GTPase est impliquée dans le recrutement de LAT à la synapse immunologique ainsi que dans sa phosphorylation après engagement du TCR. Cela suggérait un rôle de Rab6 dans la sécrétion des vésicules LAT vers la synapse. Les observations par microscopie TIRF ont montré que Rab6*a'* et LAT ne sont pas co-transportées à la synapse immunologique laissant présager un rôle de Rab6 plus en amont que le transport antérograde vers la synapse. Nous avons donc pensé que le transport du pool endocytique de LAT vers la synapse nécessiterait d'abord son retour vers l'appareil de Golgi/TGN avant d'être re-dirigé à la synapse immunologique. L'analyse d'un acteur plus spécifique du transport rétrograde endosome-TGN, la syntaxine-16,

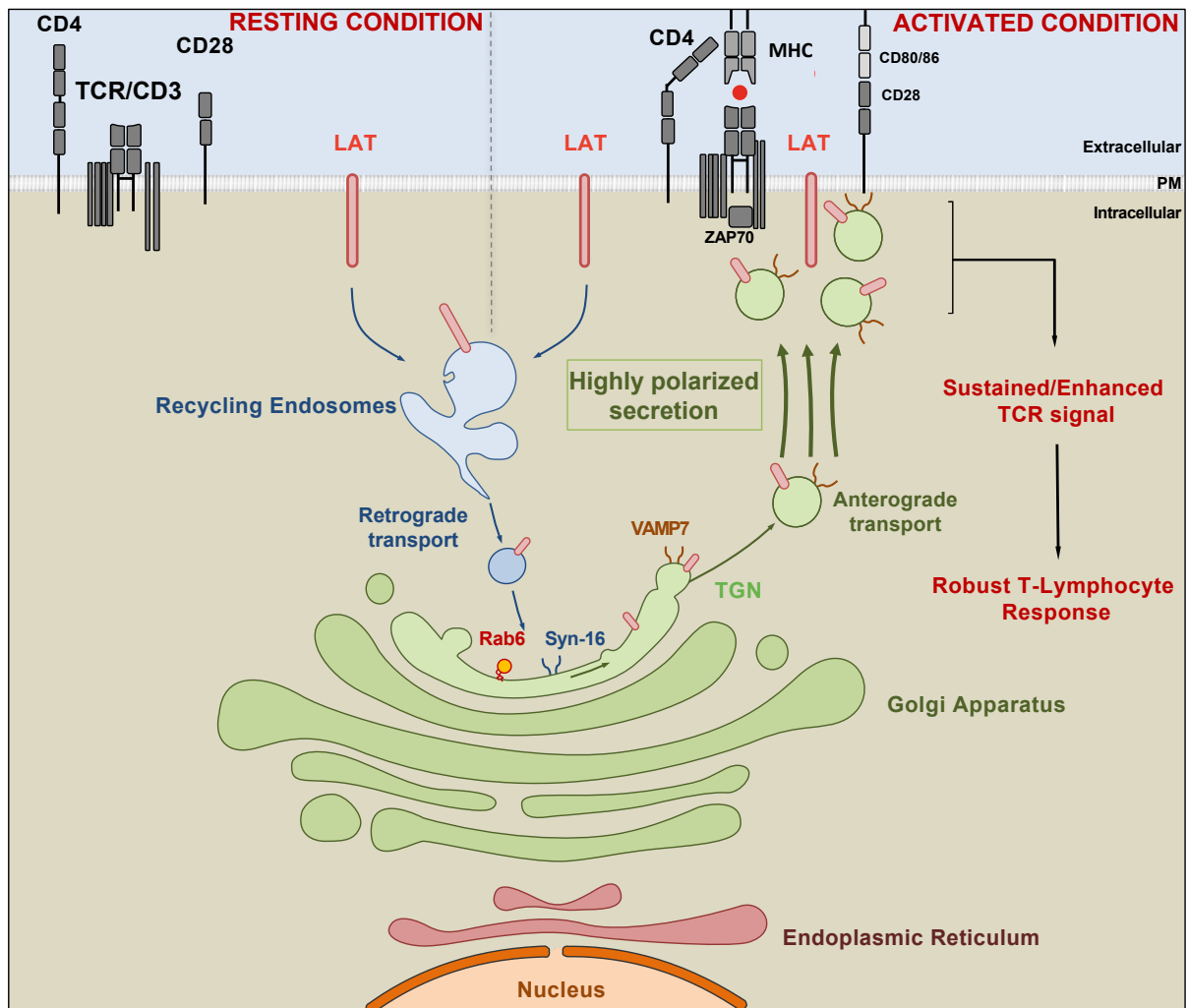


Figure 4.2.3. Hypothèse de travail - LAT est internalisé dans des endosomes précoces/de recyclage et est transporté à la synapse immunologique via une voie de transport rétrograde vers le TGN dépendante de Rab6 et de la syntaxine-16.

LAT recycle constitutivement depuis la membrane plasmique vers des endosomes précoces/de recyclage. Nos données suggèrent que les cargos LAT sont transportés par une voie rétrograde depuis ces compartiments endocytiques vers l'appareil de Golgi où Rab6 et la syntaxine-16 sont nécessaires à la re-sécrétion polarisée des vésicules LAT à la synapse immunologique. Nous proposons que cette voie de transport permet à la fraction intracellulaire de LAT d'emprunter à nouveau la machinerie de sécrétion associée à VAMP7 qui est nécessaire au transport polarisé de LAT à la synapse immunologique (Larghi et al., 2013). Cette voie de transport de LAT jouerait un rôle important dans l'activation lymphocytaire T comme le montrent les défauts observés en absence de Rab6 et de la syntaxine-16.

a permis de confirmer que cette voie est impliquée dans le recrutement de LAT à la synapse. Par ailleurs, le traitement des cellules T Jurkat avec la monensine, un inhibiteur de la sécrétion depuis le Golgi, montre une accumulation de la fraction intracellulaire de LAT dans l'appareil de Golgi suggérant de nouveau un transit de LAT dans l'appareil de Golgi. Enfin, nous avons montré que Rab6 et la syntaxine-16 sont requises pour la production d'IL-2 dans les cellules T Jurkat. Chez la souris, Rab6 est requise pour la prolifération *ex vivo* des lymphocytes T CD4⁺ en conditions de MLR. L'immunisation de chimères hématopoïétiques Rab6 cKO avec la protéine ovalbumine émulsifiée avec l'adjuvant CFA a permis de tester *in vivo* la réponse lymphocytaire T ainsi qu'un large spectre de la différenciation T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17). Nous avons montré dans ces conditions que Rab6 joue un rôle crucial dans la réponse lymphocytaire T.

Nous proposons ici un modèle (**figure 4.2.3**) dans lequel *i.* LAT est internalisée de manière constitutive, *ii.* LAT est transporté vers des compartiments endosomaux Rab11⁺, *iii.* LAT suit un transport rétrograde depuis les endosomes de recyclage vers l'appareil de Golgi/TGN, *iv.* LAT transite par le TGN avant d'être re-sécrété de façon polarisée à la synapse immunologique.

Je concentrerai ici la discussion de ces résultats sur certains points de critique et notamment certains éléments manquant à la démonstration.

4.2.2.2. Critiques/soutien/perspectives sur les interprétations faites concernant le transport rétrograde de LAT au TGN

L'analyse du transport rétrograde vers l'appareil de Golgi peut se montrer délicate dans la mesure où certains cargos transitent très dynamiquement par le TGN avant d'être transportés vers un autre compartiment. Dans le cas de LAT mais aussi de l'intégrine $\beta 1$ (Shafaq-Zadah et al., 2015), la localisation à l'état basal n'est que très faiblement détectée dans le Golgi, possiblement parce que leur transport n'est pas synchronisé. Notre modèle de transport rétrograde de LAT vers le TGN repose ainsi sur plusieurs observations. Notamment, la fraction endosomale de LAT est

redistribuée dans des compartiments golgiens lorsque les cellules sont traitées à la monensine, suggérant que cette fraction emprunte un transport rétrograde. Cependant, cette seule observation ne valide pas le modèle que nous proposons dans la mesure où la monensine constitue un outil très critiquable. Cette drogue dont les effets ne sont pas bien caractérisés peut altérer les endosomes ainsi que d'autres compartiments comme les mitochondries (Souza et al., 2005), ce que nous avons observé par microscopie électronique. Par ailleurs, bien que le traitement à la monensine des cellules T Jurkat ait été de courte durée, nos expériences ne permettaient pas de discerner le transport rétrograde vers le Golgi de la néosynthèse des molécules LAT. Des expériences similaires en présence d'un inhibiteur de la néosynthèse (par exemple, la cycloheximide) seraient donc nécessaires pour conclure.

Les arguments forts appuyant notre modèle sont les observations liées à la perturbation de la machinerie rétrograde Rab6 et, de manière plus spécifique, la syntaxine-16. Comme je l'ai souligné dans l'introduction (**partie 1.3.5.2**), cette machinerie est nécessaire au transport rétrograde et à la fonction de nombreux cargos. Cela pose donc la question de l'identité du ou des cargo(s) altéré(s). En d'autres termes, est-ce que la machinerie rétrograde transporte directement LAT ou bien d'autres cargos dont le rôle est requis pour le recrutement de LAT à la synapse immunologique ? Par exemple, le recyclage du complexe de polarité Crumbs à la membrane apicale des cellules épithéliales de drosophile est régulé par un transport rétrograde dépendant du rétromère (dVps35) (Pocha et al., 2011; Zhou et al., 2011). Dans nos conditions, nous n'avons cependant pas observé de défauts de polarisation des lymphocytes T formant une synapse immunologique en absence de Rab6. Par ailleurs, il a été montré qu'en absence de AP-3, VAMP7 est capable de suivre une voie rétrograde depuis les endosomes vers le TGN (Kent et al., 2012). Il n'est ainsi pas exclu qu'une fraction de VAMP7 recycle *via* le TGN. L'absence de Rab6 ou de la syntaxine-16 pourrait perturber le recyclage de VAMP7 et sa localisation dans la cellule. De même, la golgine-A4 est une molécule effectrice de Rab6 (Barr, 1999; Micaroni et al., 2013) et fait partie du complexe moléculaire nécessaire au transport

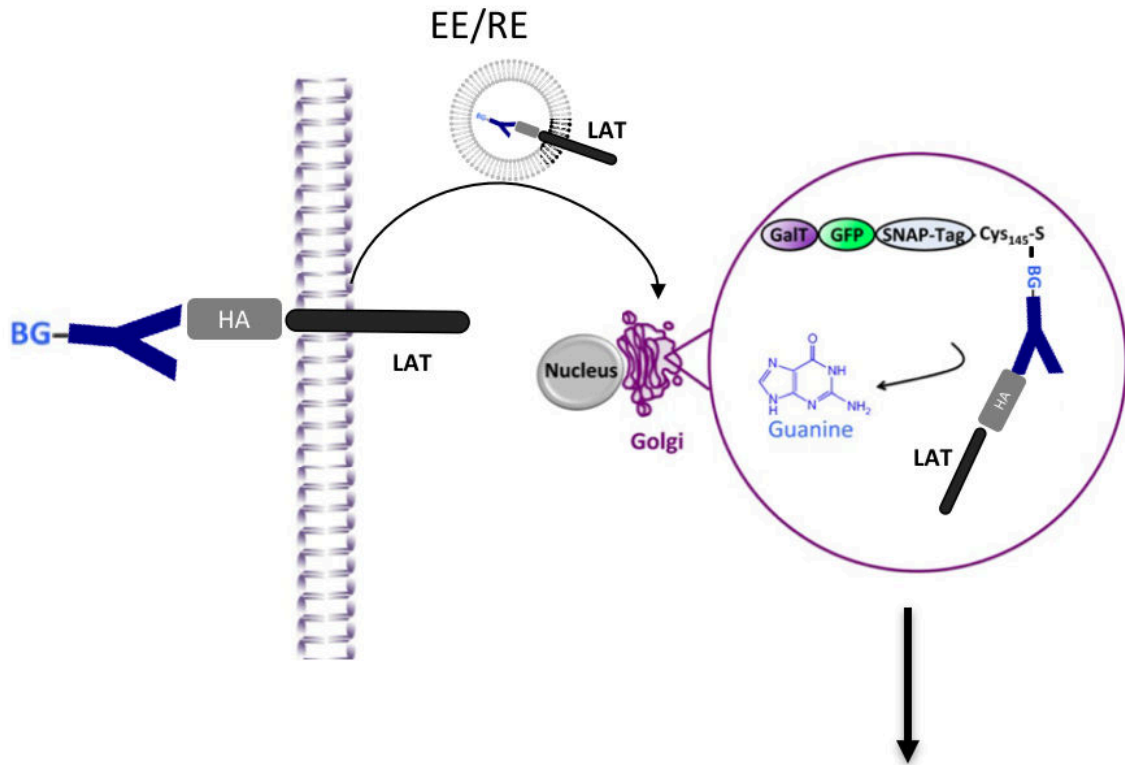
de VAMP7 depuis le TGN (Burgo et al., 2012). L'absence de Rab6 est liée dans d'autres types cellulaires à une délocalisation de la golgine-A4 qui pourrait également altérer la localisation et donc la fonction de VAMP7 (Micaroni et al., 2013). Il serait donc important de contrôler par immunofluorescence la localisation de VAMP7 dans les cellules T déficientes pour Rab6 ou la syntaxine-16.

Quelles seraient les preuves directes d'un transport de LAT par la voie rétrograde vers l'appareil de Golgi ? Un travail de notre équipe, initié par Paola Larghi et poursuivi par Laurence Bataille, a permis de développer une méthode de purification par affinité des vésicules LAT⁺ à partir de cellules T JCaM2 exprimant la forme chimérique de LAT étiquetée avec le tag OST. L'analyse protéomique a permis de mettre en évidence plusieurs acteurs du transport rétrograde enrichis dans les compartiments LAT dans les cellules T au repos et suggère que LAT emprunte cette voie de trafic intracellulaire :

i. La protéine de polarité Scrib qui régule l'activité du rétromère (de Vreede et al., 2014) et dont la présence dans les fractions de vésicules LAT purifiées a été confirmée par immunoblot.

ii. La sous-unité du rétromère SNX2 qui est également impliquée dans le transport rétrograde des endosomes vers l'appareil de Golgi (Rojas et al., 2007; Utskarpen et al., 2007).

iii. La sous-unité Vps35 du rétromère, confirmée par immunoblot et qui est impliquée spécifiquement dans le transport rétrograde depuis les endosomes vers le TGN (McGough et al., 2014). Cette sous-unité est notamment importante pour la reconnaissance de motifs au niveau de la queue cytoplasmique des cargos auxquels elle se lie. Il serait ainsi intéressant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation de LAT et Vps35 afin de déterminer si LAT est reconnue par le rétromère. Il n'est cependant pas exclu que cette reconnaissance soit médiée par une



Biochemistry : GFP-Trap or IP LAT or IP HA
Microscopy : LAT colocalization with TGN
Functional : LAT recruitment/phosphorylation

Figure 4.2.4. Expérience de « trapping » de cargo rétrograde : application à l'analyse du transport rétrograde de LAT.

Nous proposons d'exprimer dans des cellules Jurkat les constructions codant pour les molécules chimériques LAT étiquetées dans leurs parties N-terminale extracellulaires avec le peptide HA ainsi que pour la Galactosyl-Transfèrease (GalT, protéine résidente du Golgi) étiquetée avec les protéines GFP et SNAP-tag. Les cellules seront incubées avec des anticorps anti-HA conjugués avec des groupements de benzylguanine (BG) afin d'induire l'internalisation de HA-LAT dans des compartiments EE ou RE. Si le pool internalisé suit la voie rétrograde RE/Golgi les groupements BG portés par l'anticorps internalisé se lieront de manière covalente au SNAP-tag porté par GalT. L'analyse par biochimie (coimmunoprécipitation LAT/SNAP-tag) ou par microscopie (colocalisation de l'anticorps anti-HA et de la GFP) nous permettra de confirmer l'emprunt de la voie rétrograde de transport des cargos LAT depuis les endosomes vers le TGN. Adapté de (Johannes and Shafaq-Zadah, 2013).

molécule de « capping » de LAT ou d'un cargo qui suivrait la même voie et qui agirait comme un co-transporteur.

iv. Bien que nous n'ayons pas montré de rôle fonctionnel de Rab11, sa molécule effectrice Rab11-FIP1 qui est proposée dans l'arrimage des vésicules rétrogrades par interaction avec l'effecteur golgien de Rab6, la golgine-97 (Barr, 1999; Gillingham et al., 2014; Jing et al., 2010) est également enrichie dans les compartiments LAT (protéomique et immunoblot).

De plus, la présence de Rab11, VAMP7 mais aussi de VARP et de la golgine-A4 dans les compartiments LAT⁺ a été confirmé dans les éluats produits par purification par affinité des compartiments LAT. Cette approche permettrait ainsi de retracer des voies de transport de LAT associées aux compartiments endosomaux Rab11⁺, à la machinerie du rétromère régulant le transport rétrograde vers le TGN et la machinerie exocytique dépendante de VAMP7/VARP.

Enfin, la preuve directe du transport rétrograde depuis les endosomes vers le TGN résiderait dans l'observation du retour de LAT depuis la membrane plasmique au TGN. Le caractère dynamique et transitoire du passage de certains cargos par le TGN nécessite un système accumulatif telles que les approches qu'ont eu les groupes de Bruno Goud et Ludger Johannes dans la démonstration du transport rétrograde des cargos de l'intégrine $\beta 1$ à l'aide de la construction GalT-GFP-SNAP-tag (Johannes and Shafaq-Zadah, 2013; Shafaq-Zadah et al., 2015). Nous essayons actuellement d'adapter cette approche à nos questionnements (**figure 4.2.4**). En collaboration avec le groupe de Ludger Johannes, nous avons ainsi réalisé avec l'aide de Stéphanie Dogniaux, ingénieure dans notre équipe, des constructions lentivirales permettant la co-expression dans les cellules T Jurkat de : *i.* la Galactosyl-Transférase (protéine résidente du Golgi) étiquetée avec les protéines GFP et SNAP-tag, et *ii.* la forme chimérique de LAT étiquetée à sa partie N-terminale extracellulaire avec le peptide HA. L'incubation des cellules en présence d'un anticorps anti-HA conjugué avec des groupements de benzyguanine (BG) capables de se lier de manière covalente au

SNAP-tag permettra de suivre le transport du pool de LAT internalisé (**figure 4.2.4**). L'analyse de l'interaction BG-SNAP-tag par immunofluorescence ou bien par des expériences de co-immunoprécipitation nous permettra de confirmer l'entrée de la fraction endocytique de LAT dans l'appareil de Golgi. Ces expériences pourront également être réalisées en absence de Rab6 ou de la syntaxine-16 afin de valider leur fonction dans le transport rétrograde dans notre modèle d'observation.

4.2.2.3. Pourquoi un transport rétrograde de LAT ?

Le transport rétrograde de LAT depuis les endosomes vers le TGN paraît de prime abord un processus complexe et énergétiquement coûteux pour la cellule alors que le recyclage de ce cargo pourrait se faire directement depuis des compartiments endosomaux. Plusieurs arguments peuvent être avancés quant au rôle d'une voie de transport rétrograde dans le recrutement de LAT à la synapse immunologique.

Le transport hautement polarisé de LAT vers la synapse immunologique

Il a été démontré que le transport rétrograde depuis les endosomes vers le TGN est un processus crucial dans les cellules polarisées. Notamment, cette voie de trafic intracellulaire régule le transport adéquate de la protéine Crb (complexe Crumbs) et contribue ainsi à l'établissement de l'axe de polarité apico-basale dans les cellules épithéliales de drosophile (de Vreede et al., 2014; Pocha et al., 2011; Zhou et al., 2011). Dans les cellules végétales, il est proposé que le rétromère régule le transport polarisé de certains composants nécessaires à la sécrétion d'auxine, une phytohormone impliquée dans le développement et la croissance des plantes (Gao et al., 2008), suggérant un mécanisme très conservé. Dans les cellules HeLa, divers cargos empruntent les voies rétrogrades, mais plus particulièrement, certaines formes hétérodimériques inactives de l'intégrine $\beta 1$ nécessitent cette voie pour un recyclage polarisé de ces intégrines à l'avant des cellules migrantes. En absence de la machinerie de transport rétrograde, Rab6a' ou syntaxine-16, la migration persistante

des cellules est fortement altérée (Shafaq-Zadah et al., 2015). A l'inverse, les investigations menées par différents groupes suggèrent que Rab11 qui est également impliquée dans le recyclage de l'intégrine $\beta 1$ (Powelka et al., 2004) ne serait pas mise en jeu dans ce recyclage polarisé, ni dans la migration persistante (Shafaq-Zadah et al., 2015).

Comme je l'ai souligné dans l'introduction (**partie 1.2.4.6**), l'établissement de la synapse immunologique est accompagné de la polarisation des compartiments intracellulaire, notamment de l'appareil de Golgi (**Fig.1.2.11**), et du transport vésiculaire vers la zone de contact avec la CPAg. Nous pouvons ainsi supposer que le transport de LAT par la voie rétrograde contribuerait au recyclage hautement polarisé des vésicules LAT à la synapse afin de contribuer de manière efficace à la signalisation. Comme cela a été suggéré par les études de l'intégrine $\beta 1$, l'emprunt d'une voie dépendante de Rab11⁺ ne contribuerait pas efficacement à ce transport polarisé. Nos observations par microscopie confocale en absence de la syntaxine-16 ou de Rab6 (non montré) ne pointent *a priori* pas un défaut global de recyclage dans les cellules au repos dans la mesure où la localisation basale de LAT n'est pas altérée. Dans les cellules déficientes, LAT est en effet présente dans une fraction intracellulaire (Rab11⁺) et dans une fraction proche de la membrane plasmique dans les cellules non activées. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une voie de recyclage dépendante de Rab11 puisse compenser le recyclage de LAT en absence de la machinerie rétrograde sans toutefois parvenir à polariser de manière appropriée ces cargos à la synapse immunologique.

Atteindre la machinerie de sécrétion adéquate : VAMP7

Comme nous le suggérons fortement dans cette discussion, le transport de la fraction endosomale de LAT vers le TGN serait le moyen d'un retour vers la voie de sécrétion constitutive. Le TGN constituerait ainsi une plaque tournante pour les molécules LAT endocytées qui seraient prises en charge par la machinerie golgienne « professionnalisée » dans la sécrétion. Notamment le complexe golgien VAMP7/VARP/Rab21 permettrait le recyclage polarisé de LAT à la synapse

immunologique. En absence de cette machinerie, nous avons montré que le transport de LAT à la synapse immunologique est altéré (**partie 3.1 des Résultats, discuté en partie 4.2.1 de la Discussion**).

La séparation des voies de transport des molécules de signalisation

Un très grand nombre de cargos sont transportés dans des compartiments souvent très proches voire dans les mêmes compartiments. Le trafic intracellulaire de ces cargos apparaît d'autant plus confiné dans les cellules T du fait de la taille de ces cellules. Pour autant, un certain nombre de mécanismes moléculaires régule leur tri vers différentes voies de transport.

Une proportion significative de la kinase p56^{Lck} est constitutivement active dans les lymphocytes T (40 à 50%) (Nika et al., 2010). Ainsi, dans la mesure où p56^{Lck} serait capable de phosphoryler les chaînes CD3 associées au TCR mais aussi LAT (Jiang and Cheng, 2007), il paraît justifié que ces molécules de signalisation soient transportées séparément afin d'éviter une activation non désirée du lymphocyte T. Toutefois, le besoin de séparer les transports intracellulaires du TCR et notamment de CD3 ζ et LAT est plus discutable. Une colocalisation forte entre CD3 ζ et LAT est d'ailleurs observée (Bonello et al., 2004). De plus, différents résultats dont les nôtres et ceux de la littérature liés au rôle d'IFT20 dans le trafic intracellulaire des lymphocytes (Finetti et al., 2009; Vivar et al., 2015) (**partie 3.2 des Résultats, discutés en partie 4.2.1.3.iv**), mais aussi ceux du groupe d'Andrés Alcover (Soares et al., 2013a) suggèrent que le TCR et LAT partagent des effecteurs du transport intracellulaire voire qu'ils sont co-transportés. Cependant, la phosphorylation de CD3 ζ et le recrutement de ZAP-70 à la synapse immunologique en absence de Rab6 ou de la syntaxine-16 ne sont pas altérés, ce qui suggère que le TCR n'emprunte pas une voie de transport rétrograde vers le TGN. Le co-transport du TCR et de LAT pourrait se faire uniquement sur certaine portion de leur trajet. Il est également possible que ces molécules de signalisation soient transportées séparément mais partagent certains effecteurs

comme la synaptotagmine-7 nécessaire à leur arrimage/fusion à la synapse immunologique (Soares et al., 2013a)

L'appareil de Golgi comme « point de contrôle » des formes endocytées de LAT ?

L'analyse de LAT par immunoblot dans des cellules T normales montre deux formes p36/38 de tailles différentes. Des analyses ont montré que la forme p36^{LAT} est principalement ciblée dans des « rafts lipidiques » alors que p38^{LAT} est située dans des fractions solubles au triton (W. G. Zhang et al., 1998). Par ailleurs, plusieurs groupes ont montré que l'incorporation de LAT dans ces rafts dépend de la palmylation des deux résidus cystéines juxtamembranaires C26/C29 (Levental et al., 2010; W. G. Zhang et al., 1998). La présence à la fois de p36^{LAT} et p38^{LAT} dans les conditions physiologiques suggère que LAT alterne entre une localisation « rafteuse » et une localisation « non rafteuse » et donc possiblement entre différentes formes palmylées et non palmylées. Par ailleurs, la palmylation de LAT conditionne sa capacité à être phosphorylée, la forme doublement palmylée étant la plus phosphorylée après engagement du TCR (W. G. Zhang et al., 1998). Au sein des cellules, les événements de palmylation sont des réactions enzymatiques médiées par des palmyltransférases localisées au niveau de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique. Leur activité peut être contrebalancée par des enzymes de dépalmylation (Conibear and N. G. Davis, 2010). De manière intéressante, les analyses d'une forme doublement mutée de LAT (C26A/C29A) ne pouvant pas être palmylées montrent son accumulation dans l'appareil de Golgi ainsi qu'une perte de sa stabilité (Tanimura et al., 2006). Les auteurs de cette étude montrent également que l'induction d'un stress oxydatif qui bloque les réactions de palmylation présente les mêmes effets que la forme mutée de LAT. Ils proposent que cette accumulation soit liée à une redistribution de LAT depuis la membrane plasmique. Des conclusions similaires ont été tirées de l'analyse des protéines H-Ras et N-Ras dont le contrôle du transport intracellulaire par la palmylation a été bien caractérisée. Notamment, il est proposé que les protéines Ras dépalmylées à la

membrane plasmique retournent à l'appareil de Golgi (indépendamment d'un transport vésiculaire) où elles peuvent être palmylées à nouveau pour suivre une voie de re-sécrétion (Goodwin et al., 2005). Lorsque que la palmylation est bloquée par l'utilisation de drogues ou bien par l'induction de stress oxydatif, H-Ras est bloquée dans l'appareil de Golgi (Burgoyne et al., 2012; Goodwin et al., 2005). Ainsi, basé sur ces observations de la littérature, l'appareil de Golgi peut être envisagé comme un point de contrôle des molécules qui ont déjà effectué un trafic vers la périphérie cellulaire et qui ont subi des modifications de leur acylation. Dans le cas de LAT, le pool de dépalmylé en périphérie pourrait être redirigé vers le Golgi afin de subir à nouveau une palmylation et d'être re-sécrété afin de contribuer à un nouveau cycle d'activation. L'absence de palmylation de LAT est corrélée à l'état d'anergie¹ des lymphocytes T (Hundt et al., 2006). L'état de palmylation de LAT pourrait également constituer une forme de régulation physiologique de l'activation lymphocytaire T, qui serait médiée par un recyclage dépendant de l'appareil de Golgi. Une étude de la palmylation des différents pools de LAT devrait être réalisée pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Un transport rétrograde des signalosomes LAT vers le Golgi ?

Divers travaux proposent que des signalisations endomembranaires s'opèrent dans différents types cellulaires dont les lymphocytes T et notamment une signalisation Ras/MAPK dans le Golgi (Fehrenbacher et al., 2009; Mor and Philips, 2006). Cette signalisation golgienne a également été démontrée par plusieurs groupes dans les thymocytes (Daniels et al., 2006; Zou et al., 2015). Notamment, la compartimentalisation de la signalisation Ras/MAPK dans les thymocytes serait dépendante de la force du signal et la réponse induite serait conditionnée par une

¹ Etat physiologique d'un clone T qui constitue un mécanisme de tolérance notamment lorsque le lymphocyte T reconnaît un peptide du soi présenté par les cellules de l'organisme, notamment en absence de molécules de co-stimulation. Cet état est caractérisé par un état fonctionnellement inactif.

signalisation Ras/MAPK à la membrane plasmique ou au Golgi (Daniels et al., 2006). Cette compartimentalisation pourrait être liée au seul recrutement de Ras au niveau de l'appareil de Golgi. Cependant, dans la mesure où ERK1/2 est recrutée au signalosome LAT, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un transport rétrograde de LAT vers l'appareil de Golgi entraînerait également le pool de ERK1/2 associé au Golgi faisant varier la réponse cellulaire selon la localisation de la signalisation induite. Cette hypothèse pourrait être testée.

4.3. Perspectives

Ainsi, nos travaux nous ont permis de mettre en évidence le rôle du trafic intracellulaire de LAT dans la signalisation et la réponse lymphocytaire T. Notamment, nos résultats suggèrent que LAT recycle depuis la membrane plasmique par une voie de transport rétrograde entre les endosomes et l'appareil de Golgi d'une manière dépendante de la petite GTPase Rab6 et de la syntaxine-16. La re-sécrétion de LAT à la périphérie cellulaire, et dans les conditions d'activation, à la synapse immunologique serait dépendante du complexe VARP/VAMP7 et possiblement d'IFT20. Plusieurs questions dérivent de ces différents travaux. Notamment, nos observations du trafic intracellulaire de LAT mais aussi les données de la littérature sur le trafic de p56^{Lck} et du TCR suggèrent que les recrutements de leur fraction intracellulaire respective à la synapse immunologique sont conditionnés par une machinerie de recyclage constitutif. Il peut être cependant envisagé que ces voies de transport constitutives soient potentialisées par la signalisation très précoce médiée par le TCR. En effet, il a été montré dans différents types cellulaires que différentes protéines du trafic intracellulaire sont sujettes à des phosphorylations induites par des signaux extracellulaires. Ainsi, la phosphorylation de la tyrosine Y45 présente au niveau du domaine longine de VAMP7 dans les neurones, qui serait induite par une kinase de la famille Src augmente l'exocytose de cargos (Burgo et al., 2013). Nos analyses par immunoprécipitation de VAMP7 ou bien des protéines phospho-tyrosines avec des anticorps activateurs n'ont cependant pas permis de montrer cette

phosphorylation dans les cellules Jurkat activées avec des anticorps activateurs. Par ailleurs, plusieurs autres études ont montré la phosphorylation de Rab6, Rab3b et Rab8 dans les plaquettes en réponse à la thrombine et il est proposé que cette phosphorylation contribue à la dégranulation (Karniguan et al., 1993). A l'inverse, dans les cellules HeLa, Rab11 serait phosphorylée sur un résidu sérine en réponse à des stimulations longues par la PMA induisant une régulation négative du recyclage de certaines molécules.

Par ailleurs, une des questions majeures posée par notre travail est liée à la contribution relative des fractions à la membrane plasmique ou intracellulaire de LAT. Nous avons montré que le trafic intracellulaire de LAT contribue à sa phosphorylation mais nos résultats proposent également que les deux fractions de LAT contribuent différemment à la signalisation. Comme je l'ai déjà suggéré dans plusieurs points de cette discussion, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'afflux de LAT permettrait d'envoyer à la synapse immune un quantum de molécules LAT suffisamment important pour atteindre le seuil d'activation lymphocytaire, notamment en présence de faibles agonistes du TCR. Dans ces conditions, la fraction intracellulaire de LAT contribuerait à maintenir/soutenir/renforcer le signal provenant du TCR afin d'induire une réponse lymphocytaire T robuste. Les discordances entre les résultats de la réponse lymphocytaire T tardive *ex vivo* en absence de Rab6 / VAMP7 dans des systèmes d'activation avec des anticorps activateurs ou avec des CPAg (**discutés en partie 4.1.2.3**) pourraient appuyer cette idée. Nous avons souhaité tester cette hypothèse en analysant la contribution de Rab6 dans la réponse lymphocytaire T OT-II stimulés avec des CPAg pulsées avec différents peptides OVA de classe-II mutés (substitutions ou tronctions) (Robertson et al., 2000) que nous avons fait synthétiser. Notre protocole ne nous ayant pas permis d'obtenir une réponse avec les peptides mutés, nous nous proposons de réaliser ces mêmes expériences dans un système OT-I avec les peptides de classe-I mutés bien caractérisés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Advani, R.J., Bae, H.R., Bock, J.B., Chao, D.S., Doung, Y.C., Prekeris, R., Yoo, J.S., Scheller, R.H., 1998. Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. *Journal of Biological Chemistry* 273, 10317–10324.
- Aghajani, K., Keerthivasan, S., Yu, Y., Gounari, F., 2012. Generation of CD4CreER(T²) transgenic mice to study development of peripheral CD4-T-cells. *Genesis* 50, 908–913. doi:10.1002/dvg.22052
- Aguado, E., Richelme, S., Nuñez-Cruz, S., Miazek, A., Mura, A.-M., Richelme, M., Guo, X.-J., Sainy, D., He, H.-T., Malissen, B., Malissen, M., 2002. Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science* 296, 2036–2040. doi:10.1126/science.1069057
- Ajioka, R.S., Kaplan, J., 1986. Intracellular pools of transferrin receptors result from constitutive internalization of unoccupied receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6445–6449.
- Alarcón, B., Alarcón, B., Mestre, D., Mestre, D., Martínez-Martín, N., Martínez-Martín, N., 2011. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* 133, 420–425. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03458.x
- Alberts, P., Rudge, R., Hinners, I., Muzerelle, A., Martinez-Arca, S., Irinopoulou, T., Marthiens, V., Tooze, S., Rathjen, F., Gaspar, P., Galli, T., 2003. Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. *Mol. Biol. Cell* 14, 4207–4220. doi:10.1091/mbc.E03-03-0147
- Alloatti, A., Kotsias, F., Pauwels, A.-M., Carpié, J.-M., Jouve, M., Timmerman, E., Pace, L., Vargas, P., Maurin, M., Gehrmann, U., Joannas, L., Vivar, O.I., Lennon-Duménil, A.-M., Savina, A., Gevaert, K., Beyaert, R., Hoffmann, E., Amigorena, S., 2015. Toll-like Receptor 4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens. *Immunity* 43, 1087–1100. doi:10.1016/j.immuni.2015.11.006
- Amessou, M., Fradagrada, A., Falguières, T., Lord, J.M., Smith, D.C., Roberts, L.M., Lamaze, C., Johannes, L., 2007. Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J. Cell. Sci.* 120, 1457–1468. doi:10.1242/jcs.03436
- Andreotti, A.H., Schwartzberg, P.L., Joseph, R.E., Berg, L.J., 2010. T-cell signaling regulated by the Tec family kinase, Itk. 2, a002287–a002287. doi:10.1101/cshperspect.a002287
- Andrés-Delgado, L., Antón, O.M., Madrid, R., Byrne, J.A., Alonso, M.A., 2010. Formin INF2 regulates MAL-mediated transport of Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *Blood* 116, 5919–5929. doi:10.1182/blood-2010-08-300665
- Antony, C., Cibert, C., Geraud, G., Maria, A.S., Maro, B., Mayau, V., Goud, B., 1992. The Small Gtp-Binding Protein Rab6p Is Distributed From Medial Golgi to the Trans-Golgi Network as Determined by a Confocal Microscopic Approach. *J. Cell. Sci.* 103, 785–796.
- Antón, O., Batista, A., Millán, J., Andrés-Delgado, L., Puertollano, R., Correas, I., Alonso, M.A., 2008. An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 205, 3201–3213. doi:10.1084/jem.20080552
- Arantes, R.M.E., Andrews, N.W., 2006. A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 26, 4630–4637. doi:10.1523/JNEUROSCI.0009-06.2006
- Artyomov, M.N., Lis, M., Devadas, S., Davis, M.M., Chakraborty, A.K., 2010. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16916–16921. doi:10.1073/pnas.1010568107
- Au-Yeung, B.B., Melichar, H.J., Ross, J.O., Cheng, D.A., Zikherman, J., Shokat, K.M., Robey, E.A., Weiss, A., 2014. Quantitative and temporal requirements revealed for Zap70 catalytic activity during T cell development. *Nat. Immunol.* 15, 687–694. doi:10.1038/ni.2918
- Baeuerle, P.A., Baltimore, D., 1988a. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 53, 211–217. doi:10.1016/0092-8674(88)90382-0
- Baeuerle, P.A., Baltimore, D., 1988b. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242, 540–546.
- Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S., Paulos, C.M., 2014. Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front Immunol* 5, 200. doi:10.3389/fimmu.2014.00276
- Balagopalan, L., Ashwell, B.A., Bernot, K.M., Akpan, I.O., Quasba, N., Barr, V.A., Samelson, L.E., 2011. Enhanced T-cell signaling in cells bearing linker for activation of T-cell (LAT) molecules resistant to ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2885–2890. doi:10.1073/pnas.1007098108

- Balagopalan, L., Barr, V.A., Kortum, R.L., Park, A.K., Samelson, L.E., 2013. Cutting edge: cell surface linker for activation of T cells is recruited to microclusters and is active in signaling. *J. Immunol.* 190, 3849–3853. doi:10.4049/jimmunol.1202760
- Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S.C., Barr, V.A., Samelson, L.E., 2005. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat. Immunol.* 6, 80–89. doi:10.1038/ni1143
- Barda-Saad, M., Shirasu, N., Pauker, M.H., Hassan, N., Perl, O., Balbo, A., Yamaguchi, H., Houtman, J.C.D., Appella, E., Schuck, P., Samelson, L.E., 2010. Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *EMBO J.* 29, 2315–2328. doi:10.1038/emboj.2010.133
- Bardin, S., Miserey-Lenkei, S., Hurbain, I., Garcia-Castillo, D., Raposo, G., Goud, B., 2015. Phenotypic characterisation of RAB6A knockout mouse embryonic fibroblasts. *Biol. Cell* 107, 427–439. doi:10.1111/boc.201400083
- Barr, F.A., 1999. A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr. Biol.* 9, 381–384.
- Basquin, C., Malardé, V., Mellor, P., Anderson, D.H., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., Dautry-Varsat, A., Sauvonnnet, N., 2013. The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *J. Cell. Sci.* 126, 1099–1108. doi:10.1242/jcs.110932
- Basquin, C., Trichet, M., Vihinen, H., Malardé, V., Lagache, T., Ripoll, L., Jokitalo, E., Olivo-Marin, J.-C., Gautreau, A., Sauvonnnet, N., 2015. Membrane protrusion powers clathrin-independent endocytosis of interleukin-2 receptor. *EMBO J.* 34, 2147–2161. doi:10.15252/embj.201490788
- Basu, R., Whitlock, B.M., Husson, J., Le Floch, A., Jin, W., Oyler-Yaniv, A., Dotiwala, F., Giannone, G., Hivroz, C., Biais, N., Lieberman, J., Kam, L.C., Huse, M., 2016. Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* 165, 100–110. doi:10.1016/j.cell.2016.01.021
- Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., Alonso, M.A., 2004. Recruitment of Transferrin Receptor to Immunological Synapse in Response to TCR Engagement. *The Journal of Immunology* 172, 6709–6714. doi:10.4049/jimmunol.172.11.6709
- Benzing, C., Rossy, J., Gaus, K., 2013. Do signalling endosomes play a role in T cell activation? *FEBS J.* 280, 5164–5176. doi:10.1111/febs.12427
- Bertrand, F., Esquerré, M., Petit, A.-E., Rodrigues, M., Duchez, S., Delon, J., Valitutti, S., 2010. Activation of the ancestral polarity regulator protein kinase C zeta at the immunological synapse drives polarization of Th cell secretory machinery toward APCs. *J. Immunol.* 185, 2887–2894. doi:10.4049/jimmunol.1000739
- Bilal, M.Y., Houtman, J.C.D., 2015. GRB2 Nucleates T Cell Receptor-Mediated LAT Clusters That Control PLC- γ 1 Activation and Cytokine Production. *Front Immunol* 6, 141. doi:10.3389/fimmu.2015.00141
- Blanchard, N., Di Bartolo, V., Hivroz, C., 2002. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17, 389–399.
- Boerth, N.J., Sadler, J.J., Bauer, D.E., Clements, J.L., Gheith, S.M., Koretzky, G.A., 2000. Recruitment of SLP-76 to the membrane and glycolipid-enriched membrane microdomains replaces the requirement for linker for activation of T cells in T cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* 192, 1047–1058.
- Bonello, G., Blanchard, N., Montoya, M.C., Aguado, E., Langlet, C., He, H.-T., Nunez-Cruz, S., Malissen, M., Sanchez-Madrid, F., Olive, D., Hivroz, C., Collette, Y., 2004. Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J. Cell. Sci.* 117, 1009–1016. doi:10.1242/jcs.00968
- Bonifacino, J.S., Hurley, J.H., 2008. Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 427–436. doi:10.1016/j.ceb.2008.03.009
- Bonifacino, J.S., Rojas, R., 2006a. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 568–579. doi:10.1038/nrm1985
- Bonifacino, J.S., Rojas, R., 2006b. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 568–579. doi:10.1038/nrm1985
- Bouchet, J., del Río Lñiguez, I., Lasserre, R., Agüera-Gonzalez, S., Cuche, C., Danckaert, A., McCaffrey, M.W., Di Bartolo, V., Alcover, A., 2016a. Rac1-Rab11-FIP3 regulatory hub coordinates vesicle traffic with actin remodeling and T-cell activation. *EMBO J.* 35, 1160–1174. doi:10.15252/embj.201593274
- Bouchet, J., McCaffrey, M.W., Graziani, A., Alcover, A., 2016b. The functional interplay of Rab11, FIP3 and Rho proteins on the endosomal recycling pathway controls cell shape and symmetry. *Small GTPases* 1–6. doi:10.1080/21541248.2016.1224288

- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., Elledge, S.J., 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921–926. doi:10.1126/science.1152725
- Braun, V., Braun, V., Fraisier, V., Fraisier, V., Raposo, G., Hurbain, I., Hurbain, I., Sibarita, J.-B., Sibarita, J.-B., Chavrier, P., Chavrier, P., Galli, T., Niedergang, F., Niedergang, F., 2004. TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J.* 23, 4166–4176. doi:10.1038/sj.emboj.7600427
- Brignatz, C., Restouin, A., Bonello, G., Olive, D., Collette, Y., 2005. Evidences for ubiquitination and intracellular trafficking of LAT, the linker of activated T cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 108–115. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.08.009
- Briken, V., Lankar, D., Bonnerot, C., 1997. New evidence for two MHC class II-restricted antigen presentation pathways by overexpression of a small G protein. *The Journal of Immunology* 159, 4653–4658.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., Trautmann, A., 2005. Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur. J. Immunol.* 35, 1741–1753. doi:10.1002/eji.200425857
- Brownlie, R.J., Zamoyska, R., 2013. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 257–269. doi:10.1038/nri3403
- Bufi, N., Saitakis, M., Dogniaux, S., Buschinger, O., Bohineust, A., Richert, A., Maurin, M., Hivroz, C., Asnacios, A., 2015. Human Primary Immune Cells Exhibit Distinct Mechanical Properties that Are Modified by Inflammation. *Biophys. J.* 108, 2181–2190. doi:10.1016/j.bpj.2015.03.047
- Bujny, M.V., Popoff, V., Johannes, L., Cullen, P.J., 2007. The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network. *J. Cell. Sci.* 120, 2010–2021. doi:10.1242/jcs.003111
- Bunnell, S.C., Hong, D.I., Kardon, J.R., Yamazaki, T., McGlade, C.J., Barr, V.A., Samelson, L.E., 2002. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J. Cell Biol.* 158, 1263–1275. doi:10.1083/jcb.200203043
- Burd, C.G., 2011. Physiology and pathology of endosome-to-Golgi retrograde sorting. *Traffic* 12, 948–955. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01188.x
- Burgo, A., Burgo, A., Casano, A.M., Casano, A.M., Kuster, A., Kuster, A., Arold, S.T., Arold, S.T., Wang, G., Wang, G., Nola, S., Nola, S., Verraes, A., Verraes, A., Dingli, F., Dingli, F., Loew, D., Loew, D., Galli, T., 2013. Increased activity of the vesicular soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor TI-VAMP/VAMP7 by tyrosine phosphorylation in the Longin domain. *J. Biol. Chem.* 288, 11960–11972. doi:10.1074/jbc.M112.415075
- Burgo, A., Proux-Gillardeaux, V., Proux-Gillardeaux, V., Sotirakis, E., Sotirakis, E., Bun, P., Bun, P., Casano, A., Casano, A., Verraes, A., Liem, R.K.H., Liem, R.K.H., Formstecher, E., Formstecher, E., Coppey-Moisán, M., Coppey-Moisán, M., Galli, T., 2012. A Molecular Network for the Transport of the TI-VAMP/VAMP7 Vesicles from Cell Center to Periphery. *Dev Cell* 23, 166–180. doi:10.1016/j.devcel.2012.04.019
- Burgo, A., Sotirakis, E., Simmler, M.-C., Simmler, M.-C., Verraes, A., Chamot, C., Chamot, C., Simpson, J.C., Simpson, J.C., Lanzetti, L., Lanzetti, L., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., 2009. Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth. *EMBO Rep.* 10, 1117–1124. doi:10.1038/embor.2009.186
- Burgoyne, J.R., Haeussler, D.J., Kumar, V., Ji, Y., Pimental, D.R., Zee, R.S., Costello, C.E., Lin, C., McComb, M.E., Cohen, R.A., Bachschmid, M.M., 2012. Oxidation of HRas cysteine thiols by metabolic stress prevents palmitoylation in vivo and contributes to endothelial cell apoptosis. *FASEB J.* 26, 832–841. doi:10.1096/fj.11-189415
- Burguete, A.S., Fenn, T.D., Brunger, A.T., Pfeffer, S.R., 2008. Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell* 132, 286–298. doi:10.1016/j.cell.2007.11.048
- Campi, G., Varma, R., Dustin, M.L., 2005. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J. Exp. Med.* 202, 1031–1036. doi:10.1084/jem.20051182
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B.J., Oorschot, V.M.J., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H.T., Cullen, P.J., 2004. Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high-curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr. Biol.* 14, 1791–1800. doi:10.1016/j.cub.2004.09.077
- Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P., Pfeffer, S.R., 2001. Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* 292, 1373–1376. doi:10.1126/science.1056791
- Cauvin, C., Rosendale, M., Gupta-Rossi, N., Rocancourt, M., Larraufie, P., Salomon, R., Perrais, D.,

- Echard, A., 2016. Rab35 GTPase Triggers Switch-like Recruitment of the Lowe Syndrome Lipid Phosphatase OCRL on Newborn Endosomes. *Curr. Biol.* 26, 120–128. doi:10.1016/j.cub.2015.11.040
- Cebecauer, M., Humpolíčková, J., Rossy, J., 2012. Advanced imaging of cellular signaling events. *Meth. Enzymol.* 505, 273–289. doi:10.1016/B978-0-12-388448-0.00023-1
- Cemerski, S., Das, J., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., Shaw, A.S., 2008. The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* 29, 414–422. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.014
- Cerveira, J., Begum, J., Di Marco Barros, R., van der Veen, A.G., Filby, A., 2015. An imaging flow cytometry-based approach to measuring the spatiotemporal calcium mobilisation in activated T cells. *J. Immunol. Methods* 423, 120–130. doi:10.1016/j.jim.2015.04.030
- Chaîneau, M., Danglot, L., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., 2008. Role of HRB in clathrin-dependent endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 283, 34365–34373. doi:10.1074/jbc.M804587200
- Chakraborty, A.K., Weiss, A., 2014. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat. Immunol.* 15, 798–807. doi:10.1038/ni.2940
- Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., Kurosaki, T., 1995. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 14, 2499–2508.
- Chan, A.C., Irving, B.A., Fraser, J.D., Weiss, A., 1991. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 9166–9170.
- Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., Weiss, A., 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649–662.
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J.S., Russell, S.M., Weninger, W., Reiner, S.L., 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315, 1687–1691. doi:10.1126/science.1139393
- Chang, V.T., Fernandes, R.A., Ganzinger, K.A., Lee, S.F., Siebold, C., McColl, J., Jönsson, P., Palayret, M., Harlos, K., Coles, C.H., Jones, E.Y., Lui, Y., Huang, E., Gilbert, R.J.C., Klenerman, D., Aricescu, A.R., Davis, S.J., 2016. Initiation of T cell signaling by CD45 segregation at 'close contacts'. *Nat. Immunol.* 17, 574–582. doi:10.1038/ni.3392
- Chemin, K., Bohineust, A., Dogniaux, S., Tourret, M., Guégan, S., Miro, F., Hivroz, C., 2012. Cytokine secretion by CD4+ T cells at the immunological synapse requires Cdc42-dependent local actin remodeling but not microtubule organizing center polarity. *J. Immunol.* 189, 2159–2168. doi:10.4049/jimmunol.1200156
- Chen, D., Guo, J.R., Gahl, W.A., 1997. rab GTPases expressed in human melanoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1355, 1–6.
- Chen, L., Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 227–242. doi:10.1038/nri3405
- Chen, Y.A., Scheller, R.H., 2001. Snare-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 98–106. doi:10.1038/35052017
- Chevallier, J., Koop, C., Srivastava, A., Petrie, R.J., Lamarche-Vane, N., Presley, J.F., 2009. Rab35 regulates neurite outgrowth and cell shape. *FEBS Lett.* 583, 1096–1101. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.012
- Chevrier, S., Genton, C., Malissen, B., Malissen, M., Acha-Orbea, H., 2012. Dominant Role of CD80-CD86 Over CD40 and ICOSL in the Massive Polyclonal B Cell Activation Mediated by LAT(Y136F) CD4(+) T Cells. *Front Immunol* 3, 27. doi:10.3389/fimmu.2012.00027
- Choudhuri, K., Wiseman, D., Brown, M.H., Gould, K., van der Merwe, P.A., 2005. T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand. *Nature* 436, 578–582. doi:10.1038/nature03843
- Chow, C.W., Rincón, M., Davis, R.J., 1999. Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol. Cell Biol.* 19, 2300–2307.
- Chuck, M.I., Zhu, M., Shen, S., Zhang, W., 2010. The role of the LAT-PLC-gamma1 interaction in T regulatory cell function. *J. Immunol.* 184, 2476–2486. doi:10.4049/jimmunol.0902876
- Chum, T., Glatzová, D., Kvičalová, Z., Malínský, J., Brdicka, T., Cebecauer, M., 2016. The role of palmitoylation and transmembrane domain in sorting of transmembrane adaptor proteins. *J. Cell. Sci.* 129, 95–107. doi:10.1242/jcs.175190
- Combs, J., Kim, S.J., Tan, S., Ligon, L.A., Holzbaur, E.L.F., Kuhn, J., Poenie, M., 2006. Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14883–14888.

doi:10.1073/pnas.0600914103

- Comrie, W.A., Babich, A., Burkhardt, J.K., 2015a. F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *J. Cell Biol.* 208, 475–491. doi:10.1083/jcb.201406121
- Comrie, W.A., Li, S., Boyle, S., Burkhardt, J.K., 2015b. The dendritic cell cytoskeleton promotes T cell adhesion and activation by constraining ICAM-1 mobility. *J. Cell Biol.* 208, 457–473. doi:10.1083/jcb.201406120
- Conibear, E., Davis, N.G., 2010. Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance. *J. Cell. Sci.* 123, 4007–4010. doi:10.1242/jcs.059287
- Cordoba, S.-P., Choudhuri, K., Zhang, H., Bridge, M., Basat, A.B., Dustin, M.L., van der Merwe, P.A., 2013. The large ectodomains of CD45 and CD148 regulate their segregation from and inhibition of ligated T-cell receptor. *Blood* 121, 4295–4302. doi:10.1182/blood-2012-07-442251
- Côte, M., Ménager, M.M., Burgess, A., Mahlaoui, N., Picard, C., Schaffner, C., Al-Manjomi, F., Al-Harbi, M., Alangari, A., le Deist, F., Gennery, A.R., Prince, N., Cariou, A., Nitschke, P., Blank, U., El-Ghazali, G., Ménasché, G., Latour, S., Fischer, A., de Saint Basile, G., 2009. Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *J. Clin. Invest.* 119, 3765–3773. doi:10.1172/JCI40732
- Danglot, L., Chaineau, M., Dahan, M., Gendron, M.-C., Boggetto, N., Perez, F., Galli, T., 2010. Role of TI-VAMP and CD82 in EGFR cell-surface dynamics and signaling. *J. Cell. Sci.* 123, 723–735. doi:10.1242/jcs.062497
- Danglot, L., Zylbersztein, K., Petkovic, M., Gauberti, M., Meziane, H., Combe, R., Champy, M.-F., Birling, M.-C., Pavlovic, G., Bizot, J.-C., Trovero, F., Ragione, Della, F., Proux-Gillardeaux, V., Sorg, T., Vivien, D., D'Esposito, M., Galli, T., 2012. Absence of TI-VAMP/Vamp7 leads to increased anxiety in mice. *J. Neurosci.* 32, 1962–1968. doi:10.1523/JNEUROSCI.4436-11.2012
- Daniels, M.A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Holländer, G.A., Gascoigne, N.R.J., Palmer, E., 2006. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signaling. *Nature* 444, 724–729. doi:10.1038/nature05269
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., Mellman, I., 1996. Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9559–9564.
- Das, V., Nal, B., Dujeancourt, A., Thoulouze, M.I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., Alcover, A., 2004. Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse: Involvement of SNARE complexes. *Immunity* 20, 577–588. doi:10.1016/S1074-7613(04)00106-2
- Daste, F., Galli, T., Tareste, D., 2015. Structure and function of longin SNAREs. *J. Cell. Sci.* 128, 4263–4272. doi:10.1242/jcs.178574
- Davis, S.J., van der Merwe, P.A., 2006. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* 7, 803–809. doi:10.1038/ni1369
- de Saint Basile, G., Ménasché, G., Fischer, A., 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 568–579. doi:10.1038/nri2803
- de Vreede, G., Schoenfeld, J.D., Windler, S.L., Morrison, H., Lu, H., Bilder, D., 2014. The Scribble module regulates retromer-dependent endocytic trafficking during epithelial polarization. *Development* 141, 2796–2802. doi:10.1242/dev.105403
- Deguchi-Tawarada, M., Inoue, E., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Ohtsuka, T., Takai, Y., 2004. CAST2: identification and characterization of a protein structurally related to the presynaptic cytomatrix protein CAST. *Genes Cells* 9, 15–23. doi:10.1111/j.1365-2443.2004.00697.x
- Deindl, S., Kadlecsek, T.A., Brdicka, T., Cao, X., Weiss, A., Kuriyan, J., 2007. Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* 129, 735–746. doi:10.1016/j.cell.2007.03.039
- Del Nery, E., Miserey-Lenkei, S., Falguières, T., Nizak, C., Johannes, L., Perez, F., Goud, B., 2006. Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* 7, 394–407. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00395.x
- Dennis, M.K., Delevoye, C., Acosta-Ruiz, A., Hurbain, I., Romao, M., Hesketh, G.G., Goff, P.S., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Luzio, J.P., Galli, T., Owen, D.J., Raposo, G., Marks, M.S., 2016. BLOC-1 and BLOC-3 regulate VAMP7 cycling to and from melanosomes via distinct tubular transport carriers. *J. Cell Biol.* 214, 293–308. doi:10.1083/jcb.201605090
- Derby, M.C., Lieu, Z.Z., Brown, D., Stow, J.L., Goud, B., Gleeson, P.A., 2007. The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. *Traffic* 8, 758–773. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00563.x
- Deretic, D., 1998. Post-Golgi trafficking of rhodopsin in retinal photoreceptors. *Eye (Lond)* 12 (Pt 3b), 526–530. doi:10.1038/eye.1998.141

- Deretic, D., Papermaster, D.S., 1993. Rab6 is associated with a compartment that transports rhodopsin from the trans-Golgi to the site of rod outer segment disk formation in frog retinal photoreceptors. *J. Cell. Sci.* 106 (Pt 3), 803–813.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J.J., Lombard, B., Loew, D., Gautreau, A., 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell* 17, 712–723. doi:10.1016/j.devcel.2009.09.010
- Di Bartolo, V., Mège, D., Germain, V., Pelosi, M., Dufour, E., Michel, F., Magistrelli, G., Isacchi, A., Acuto, O., 1999. Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* 274, 6285–6294.
- Di Bartolo, V., Montagne, B., Salek, M., Jungwirth, B., Carrette, F., Fournane, J., Sol-Foulon, N., Michel, F., Schwartz, O., Lehmann, W.D., Acuto, O., 2007. A novel pathway down-modulating T cell activation involves HPK-1-dependent recruitment of 14-3-3 proteins on SLP-76. *J. Exp. Med.* 204, 681–691. doi:10.1084/jem.20062066
- Dietrich, J., Kastrop, J., Nielsen, B.L., Odum, N., Geisler, C., 1997. Regulation and function of the CD3 gamma DxxxLL motif: A binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol* 138, 271–281. doi:10.1083/jcb.138.2.271
- Díaz, E., Pfeffer, S.R., 1998. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 93, 433–443.
- Dong, S., Corre, B., Foulon, E., Dufour, E., Veillette, A., Acuto, O., Michel, F., 2006. T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J. Exp. Med.* 203, 2509–2518. doi:10.1084/jem.20060650
- Douglass, A.D., Vale, R.D., 2005. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 121, 937–950. doi:10.1016/j.cell.2005.04.009
- Dressel, R., Dressel, R., Elsner, L., Elsner, L., Novota, P., Novota, P., Kanwar, N., Kanwar, N., Fischer von Mollard, G., Fischer von Mollard, G., 2010. The exocytosis of lytic granules is impaired in Vti1b- or Vamp8-deficient CTL leading to a reduced cytotoxic activity following antigen-specific activation. *J. Immunol.* 185, 1005–1014. doi:10.4049/jimmunol.1000770
- Duncan, J.R., Kornfeld, S., 1988. Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 106, 617–628.
- Duplay, P., Thome, M., Hervé, F., Acuto, O., 1994. p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J. Exp. Med.* 179, 1163–1172.
- Dustin, M.L., Colman, D.R., 2002. Neural and immunological synaptic relations. *Science* 298, 785–789. doi:10.1126/science.1076386
- Dustin, M.L., Depoil, D., 2011. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 672–684. doi:10.1038/nri3066
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., Goud, B., 1998. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279, 580–585.
- Echard, A., Opdam, F., de Leeuw, H., Jollivet, F., Savelkoul, P., Hendriks, W., Voorberg, J., Goud, B., Fransen, J., 2000. Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms. *Mol. Biol. Cell* 11, 3819–3833.
- Ehrlich, L.I.R., Ebert, P.J.R., Krummel, M.F., Weiss, A., Davis, M.M., 2002. Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity* 17, 809–822.
- Facchetti, F., Chan, J.K., Zhang, W., Tironi, A., Chilosi, M., Parolini, S., Notarangelo, L.D., Samelson, L.E., 1999. Linker for activation of T cells (LAT), a novel immunohistochemical marker for T cells, NK cells, mast cells, and megakaryocytes: evaluation in normal and pathological conditions. *Am. J. Pathol.* 154, 1037–1046. doi:10.1016/S0002-9440(10)65356-4
- Fader, C.M., Aguilera, M.O., Colombo, M.I., 2012. ATP is released from autophagic vesicles to the extracellular space in a VAMP7-dependent manner. *autophagy* 8, 12–27. doi:10.4161/auto.21858
- Fader, C.M., Sánchez, D.G., Sánchez, D.G., Mestre, M.B., Mestre, M.B., Colombo, M.I., 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1901–1916. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.011
- Favier, B., Burroughs, N.J., Wedderburn, L., Valitutti, S., 2001. TCR dynamics on the surface of living T cells. *Int. Immunol.* 13, 1525–1532. doi:10.1093/intimm/13.12.1525
- Fehrenbacher, N., Bar-Sagi, D., Philips, M., 2009. Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol* 3, 297–307. doi:10.1016/j.molonc.2009.06.004
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F.,

- Fischer, A., Saint Basile, G.D., 2003. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115, 461–473.
- Fernandes, H., Franklin, E., Jollivet, F., Bliedtner, K., Khan, A.R., 2012. Mapping the interactions between a RUN domain from DENND5/Rab61P1 and sorting nexin 1. *PLoS ONE* 7, e35637. doi:10.1371/journal.pone.0035637
- Feske, S., 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 690–702. doi:10.1038/nri2152
- Filippini, F., Rossi, V., Galli, T., Budillon, A., D'Urso, M., D'Esposito, M., 2001. Longins: a new evolutionary conserved VAMP family sharing a novel SNARE domain. *Trends Biochem. Sci.* 26, 407–409.
- Finco, T.S., Kadlecsek, T., Zhang, W.G., Samelson, L.E., Weiss, A., 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLC gamma 1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617–626. doi:10.1016/S1074-7613(00)80659-7
- Finetti, F., Paccani, S.R., Riparbelli, M.G., Giacomello, E., Perinetti, G., Pazour, G.J., Rosenbaum, J.L., Baldari, C.T., 2009. Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat. Cell Biol.* 11, 1332–1339. doi:10.1038/ncb1977
- Finetti, F., Patrussi, L., Galgano, D., Cassioli, C., Perinetti, G., Pazour, G.J., Baldari, C.T., 2015. The small GTPase Rab8 interacts with VAMP-3 to regulate the delivery of recycling T-cell receptors to the immune synapse. *J. Cell. Sci.* 128, 2541–2552. doi:10.1242/jcs.171652
- Finetti, F., Patrussi, L., Masi, G., Onnis, A., Galgano, D., Lucherini, O.M., Pazour, G.J., Baldari, C.T., 2014. Specific recycling receptors are targeted to the immune synapse by the intraflagellar transport system. *J. Cell. Sci.* 127, 1924–1937. doi:10.1242/jcs.139337
- Fischer, A., Picard, C., Chemin, K., Dogniaux, S., le Deist, F., Hivroz, C., 2010. ZAP70: a master regulator of adaptive immunity. *32*, 107–116. doi:10.1007/s00281-010-0196-x
- Follit, J.A., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., Pazour, G.J., 2006. The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol. Biol. Cell* 17, 3781–3792. doi:10.1091/mbc.E06-02-0133
- Fontijn, R.D., Goud, B., Echard, A., Jollivet, F., van Marle, J., Pannekoek, H., Horrevoets, A.J., 2001. The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2944–2955. doi:10.1128/MCB.21.8.2944-2955.2001
- Freeman, C.L., Hesketh, G., Seaman, M.N.J., 2014. RME-8 coordinates the activity of the WASH complex with the function of the retromer SNX dimer to control endosomal tubulation. *J. Cell. Sci.* 127, 2053–2070. doi:10.1242/jcs.144659
- Fu, G., Casas, J., Rigaud, S., Rybakin, V., Lambomez, F., Brzostek, J., Hoerter, J.A.H., Paster, W., Acuto, O., Cheroutre, H., Sauer, K., Gascoigne, N.R.J., 2013a. Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* 504, 441–445. doi:10.1038/nature12718
- Fu, G., Casas, J., Rigaud, S., Rybakin, V., Lambomez, F., Brzostek, J., Hoerter, J.A.H., Paster, W., Acuto, O., Cheroutre, H., Sauer, K., Gascoigne, N.R.J., 2013b. Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* 504, 441–445. doi:10.1038/nature12718
- Fu, G., Vallée, S., Rybakin, V., McGuire, M.V., Ampudia, J., Brockmeyer, C., Salek, M., Fallen, P.R., Hoerter, J.A.H., Munshi, A., Huang, Y.H., Hu, J., Fox, H.S., Sauer, K., Acuto, O., Gascoigne, N.R.J., 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* 10, 848–856. doi:10.1038/ni.1766
- Fukuda, M., 2016. Multiple Roles of VARP in Endosomal Trafficking: Rabs, Retromer Components and R-SNARE VAMP7 Meet on VARP. *Traffic* 17, 709–719. doi:10.1111/tra.12406
- Fuller, D.M., Zhu, M., Koonpaew, S., Nelson, M.I., Zhang, W., 2012. The importance of the Erk pathway in the development of linker for activation of T cells-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* 189, 4005–4013. doi:10.4049/jimmunol.1201380
- Galli, T., Chilcote, T., Mundigl, O., Binz, T., Niemann, H., Decamilli, P., 1994. Tetanus Toxin-Mediated Cleavage of Cellubrevin Impairs Exocytosis of Transferrin Receptor-Containing Vesicles in Cho Cells. *J. Cell Biol.* 125, 1015–1024.
- Galli, T., Zahraoui, A., Vaidyanathan, V.V., Raposo, G., Tian, J.M., Karin, M., Niemann, H., Louvard, D., 1998. A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 1437–1448.
- Gallop, J.L., McMahon, H.T., 2005. BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem. Soc. Symp.* 223–231.
- Galvez, T., Gilleron, J., Zerial, M., O'Sullivan, G.A., 2012. SnapShot: Mammalian Rab proteins in endocytic trafficking. *Cell* 151, 234–234.e2. doi:10.1016/j.cell.2012.09.013

- Ganley, I.G., Espinosa, E., Pfeffer, S.R., 2008. A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J. Cell Biol.* 180, 159–172. doi:10.1083/jcb.200707136
- Gao, X., Nagawa, S., Wang, G., Yang, Z., 2008. Cell polarity signaling: focus on polar auxin transport. *Mol Plant* 1, 899–909. doi:10.1093/mp/ssn069
- Genton, C., Wang, Y., Izui, S., Malissen, B., Delsol, G., Fournié, G.J., Malissen, M., Acha-Orbea, H., 2006. The Th2 lymphoproliferation developing in LatY136F mutant mice triggers polyclonal B cell activation and systemic autoimmunity. *The Journal of Immunology* 177, 2285–2293. doi:10.4049/jimmunol.177.4.2285
- Geuze, H.J., Stoorvogel, W., Strous, G.J., Slot, J.W., Bleekemolen, J.E., Mellman, I., 1988. Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytic vesicles. *J Cell Biol* 107, 2491–2501.
- Gérard, A., Mertens, A.E.E., van der Kammen, R.A., Collard, J.G., 2007. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J. Cell Biol.* 176, 863–875. doi:10.1083/jcb.200608161
- Ghosh, R.N., Mallet, W.G., Soe, T.T., McGraw, T.E., Maxfield, F.R., 1998. An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J Cell Biol* 142, 923–936.
- Gillingham, A.K., Sinka, R., Torres, I.L., Lilley, K.S., Munro, S., 2014. Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev Cell* 31, 358–373. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.007
- Goldsmith, M.A., Dazin, P.F., Weiss, A., 1988. At least two non-antigen-binding molecules are required for signal transduction by the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8613–8617.
- Goldsmith, M.A., Weiss, A., 1988. Generation and analysis of a T-lymphocyte somatic mutant for studying molecular aspects of signal transduction by the antigen receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 546, 91–103.
- Goldsmith, M.A., Weiss, A., 1987. Isolation and characterization of a T-lymphocyte somatic mutant with altered signal transduction by the antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6879–6883.
- Gomez, T.S., Billadeau, D.D., 2009. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell* 17, 699–711. doi:10.1016/j.devcel.2009.09.009
- Gonatas, N.K., Steiber, A., Kim, S.U., Graham, D.I., Avrameas, S., 1975. Internalization of neuronal plasma membrane ricin receptors into the Golgi apparatus. *Experimental Cell Research* 94, 426–431.
- Goodwin, J.S., Drake, K.R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Philips, M.R., Kenworthy, A.K., 2005. Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* 170, 261–272. doi:10.1083/jcb.200502063
- Gorska, M.M., Alam, R., 2012. A mutation in the human Uncoordinated 119 gene impairs TCR signaling and is associated with CD4 lymphopenia. *Blood* 119, 1399–1406. doi:10.1182/blood-2011-04-350686
- Gorska, M.M., Liang, Q., Karim, Z., Alam, R., 2009. Uncoordinated 119 protein controls trafficking of Lck via the Rab11 endosome and is critical for immunological synapse formation. *J. Immunol.* 183, 1675–1684. doi:10.4049/jimmunol.0900792
- Gorska, M.M., Stafford, S.J., Cen, O., Sur, S., Alam, R., 2004. Unc119, a novel activator of Lck/Fyn, is essential for T cell activation. *J. Exp. Med.* 199, 369–379. doi:10.1084/jem.20030589
- Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., Saraste, J., 1990. Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345, 553–556. doi:10.1038/345553a0
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L., 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227. doi:10.1126/science.285.5425.221
- Grassart, A., Dujancourt, A., Lazarow, P.B., Dautry-Varsat, A., Sauvonnnet, N., 2008. Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO Rep.* 9, 356–362. doi:10.1038/embor.2008.28
- Griffin, C.T., Trejo, J., Magnuson, T., 2005. Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15173–15177. doi:10.1073/pnas.0409558102
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P.S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I.V., Grosveld, F., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., 2007. Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell* 13, 305–314. doi:10.1016/j.devcel.2007.06.010
- Grigoriev, I., Yu, K.L., Martinez-Sanchez, E., Serra-Marques, A., Smal, I., Meijering, E., Demmers, J., Peränen, J., Pasterkamp, R.J., van der Sluijs, P., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., 2011a. Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr. Biol.* 21,

- 967–974. doi:10.1016/j.cub.2011.04.030
- Grigoriev, I., Yu, K.L., Martinez-Sanchez, E., Serra-Marques, A., Smal, I., Meijering, E., Demmers, J., Peränen, J., Pasterkamp, R.J., van der Sluijs, P., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., 2011b. Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr. Biol.* 21, 967–974. doi:10.1016/j.cub.2011.04.030
- Gupton, S.L., Gertler, F.B., 2010. Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis. *Dev Cell* 18, 725–736. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.017
- Guy, C.S., Vignali, K.M., Temirov, J., Bettini, M.L., Overacre, A.E., Smeltzer, M., Zhang, H., Huppa, J.B., Tsai, Y.-H., Lobry, C., Xie, J., Dempsey, P.J., Crawford, H.C., Aifantis, I., Davis, M.M., Vignali, D.A.A., 2013. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat. Immunol.* 14, 262–270. doi:10.1038/ni.2538
- Haddad, E.K., Wu, X.F., Hammer, J.A., Henkart, P.A., 2001. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J. Cell Biol.* 152, 835–841.
- Hamad, A.R., O'Herrin, S.M., Lebowitz, M.S., Srikrishnan, A., Bieler, J., Schneck, J., Pardoll, D., 1998. Potent T cell activation with dimeric peptide-major histocompatibility complex class II ligand: the role of CD4 coreceptor. *J. Exp. Med.* 188, 1633–1640.
- Harbour, M.E., Breusegem, S.Y.A., Antrobus, R., Freeman, C., Reid, E., Seaman, M.N.J., 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J. Cell. Sci.* 123, 3703–3717. doi:10.1242/jcs.071472
- Harding, A., Hancock, J.F., 2008. Ras nanoclusters: combining digital and analog signaling. *Cell Cycle* 7, 127–134. doi:10.4161/cc.7.2.5237
- Harriff, M.J., Karamooz, E., Burr, A., Grant, W.F., Canfield, E.T., Sorensen, M.L., Moita, L.F., Lewinsohn, D.M., 2016. Endosomal MR1 Trafficking Plays a Key Role in Presentation of Mycobacterium tuberculosis Ligands to MAIT Cells. *PLoS Pathog.* 12, e1005524. doi:10.1371/journal.ppat.1005524
- Hayes, G.L., Brown, F.C., Haas, A.K., Nottingham, R.M., Barr, F.A., Pfeffer, S.R., 2009. Multiple Rab GTPase binding sites in GCC185 suggest a model for vesicle tethering at the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell* 20, 209–217. doi:10.1091/mbc.E08-07-0740
- Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A., Davis, M.M., 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins., *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Hermiston, M.L., Xu, Z., Weiss, A., 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 107–137. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946
- Hesketh, G.G., Pérez-Dorado, I., Jackson, L.P., Wartosch, L., Schäfer, I.B., Gray, S.R., McCoy, A.J., Zeldin, O.B., Garman, E.F., Harbour, M.E., Evans, P.R., Seaman, M.N.J., Luzio, J.P., Owen, D.J., 2014. VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Dev Cell* 29, 591–606. doi:10.1016/j.devcel.2014.04.010
- Hill, E., Clarke, N., Barr, F.A., 2000. The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J.* 19, 5711–5719. doi:10.1093/emboj/19.21.5711
- Hivroz, C., Saitakis, M., 2016. Biophysical Aspects of T Lymphocyte Activation at the Immune Synapse. *Front Immunol* 7, 46. doi:10.3389/fimmu.2016.00046
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., Jameson, S.C., 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 772–782. doi:10.1038/nri1707
- Holt, O., Kanno, E., Bossi, G., Booth, S., Daniele, T., Santoro, A., Arico, M., Saegusa, C., Fukuda, M., Griffiths, G.M., 2008. Slp1 and Slp2-a localize to the plasma membrane of CTL and contribute to secretion from the immunological synapse. *Traffic* 9, 446–457. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00714.x
- Houghton, F.J., Chew, P.L., Lodeho, S., Goud, B., Gleeson, P.A., 2009. The localization of the Golgin GCC185 is independent of Rab6A/A' and Arl1. *Cell* 138, 787–794. doi:10.1016/j.cell.2009.05.048
- Houtman, J.C.D., Yamaguchi, H., Barda-Saad, M., Braiman, A., Bowden, B., Appella, E., Schuck, P., Samelson, L.E., 2006. Oligomerization of signaling complexes by the multipoint binding of GRB2 to both LAT and SOS1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 798–805. doi:10.1038/nsmb1133
- Huang, J., Brameshuber, M., Zeng, X., Xie, J., Li, Q.-J., Chien, Y.-H., Valitutti, S., Davis, M.M., 2013. A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells. *Immunity* 39, 846–857. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.036
- Huang, W.Y.C., Yan, Q., Lin, W.-C., Chung, J.K., Hansen, S.D., Christensen, S.M., Tu, H.-L., Kuriyan, J., Groves, J.T., 2016. Phosphotyrosine-mediated LAT assembly on membranes drives kinetic bifurcation in recruitment dynamics of the Ras activator SOS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 8218–8223. doi:10.1073/pnas.1602602113
- Hundt, M., Harada, Y., De Giorgio, L., Tanimura, N., Zhang, W., Altman, A., 2009. Palmitoylation-Dependent Plasma Membrane Transport but Lipid Raft-Independent Signaling by Linker for

- Activation of T Cells. *J. Immunol.* 183, 1685–1694. doi:10.4049/jimmunol.0803921
- Hundt, M., Tabata, H., Jeon, M.-S., Hayashi, K., Tanaka, Y., Krishna, R., De Giorgio, L., Liu, Y.-C., Fukata, M., Altman, A., 2006. Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect. *Immunity* 24, 513–522. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.011
- Hurov, J.B., Stappenbeck, T.S., Zmasek, C.M., White, L.S., Ranganath, S.H., Russell, J.H., Chan, A.C., Murphy, K.M., Piwnica-Worms, H., 2001. Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (Par-1) protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3206–3219. doi:10.1128/MCB.21.9.3206-3219.2001
- Hurov, J.B., Watkins, J.L., Piwnica-Worms, H., 2004. Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr. Biol.* 14, 736–741. doi:10.1016/j.cub.2004.04.007
- Huse, M., 2012. Microtubule-organizing center polarity and the immunological synapse: protein kinase C and beyond. *Front Immunol* 3. doi:10.3389/fimmu.2012.00235
- Huse, M., Lillemeier, B.F., Kuhns, M.S., Chen, D.S., Davis, M.M., 2006. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat. Immunol.* 7, 247–255. doi:10.1038/ni1304
- Husson, J., Chemin, K., Bohineust, A., Hivroz, C., Henry, N., 2011. Force Generation upon T Cell Receptor Engagement. *PLoS ONE* 6. doi:10.1371/journal.pone.0019680
- Imamura, T., Huang, J., Usui, I., Satoh, H., Bever, J., Olefsky, J.M., 2003. Insulin-Induced GLUT4 Translocation Involves Protein Kinase C- Mediated Functional Coupling between Rab4 and the Motor Protein Kinesin. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4892–4900. doi:10.1128/MCB.23.14.4892-4900.2003
- Itoh, T., De Camilli, P., 2006. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 897–912. doi:10.1016/j.bbali.2006.06.015
- Janoueix-Lerosey, I., Jollivet, F., Camonis, J., Marche, P.N., Goud, B., 1995. Two-hybrid system screen with the small GTP-binding protein Rab6. Identification of a novel mouse GDP dissociation inhibitor isoform and two other potential partners of Rab6. *Journal of Biological Chemistry* 270, 14801–14808.
- Jenkins, M.R., Tsun, A., Stinchcombe, J.C., Griffiths, G.M., 2009. The strength of T cell receptor signal controls the polarization of cytotoxic machinery to the immunological synapse. *Immunity* 31, 621–631. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.024
- Jeong, K., Kwon, H., Lee, J., Jang, D., Hwang, E.M., Park, J.-Y., Pak, Y., 2012. Rab6-mediated retrograde transport regulates inner nuclear membrane targeting of caveolin-2 in response to insulin. *Traffic* 13, 1218–1233. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01378.x
- Jia, D., Gomez, T.S., Billadeau, D.D., Rosen, M.K., 2012. Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer. *Mol. Biol. Cell* 23, 2352–2361. doi:10.1091/mbc.E11-12-1059
- Jiang, Y., Cheng, H., 2007. Evidence of LAT as a dual substrate for Lck and Syk in T lymphocytes. *Leuk. Res.* 31, 541–545. doi:10.1016/j.leukres.2006.07.010
- Jing, J., Junutula, J.R., Wu, C., Burden, J., Matern, H., Peden, A.A., Prekeris, R., 2010. FIP1/RCP binding to Golgin-97 regulates retrograde transport from recycling endosomes to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* 21, 3041–3053. doi:10.1091/mbc.E10-04-0313
- Johannes, L., Popoff, V., 2008. Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* 135, 1175–1187. doi:10.1016/j.cell.2008.12.009
- Johannes, L., Shafaq-Zadah, M., 2013. SNAP-tagging the retrograde route. *Methods Cell Biol.* 118, 139–155. doi:10.1016/B978-0-12-417164-0.00009-4
- Johannes, L., Wunder, C., 2011a. Retrograde transport: two (or more) roads diverged in an endosomal tree? *Traffic* 12, 956–962. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01200.x
- Johannes, L., Wunder, C., 2011b. The SNXy flavours of endosomal sorting. *Nat. Cell Biol.* 13, 884–886. doi:10.1038/ncb2300
- Johns, H.L., Gonzalez-Lopez, C., Sayers, C.L., Hollinshead, M., Elliott, G., 2014. Rab6 dependent post-Golgi trafficking of HSV1 envelope proteins to sites of virus envelopment. *Traffic* 15, 157–178. doi:10.1111/tra.12134
- Jones, S.M., CROSBY, J.R., SALAMERO, J., Howell, K.E., 1993. A Cytosolic Complex of P62 and Rab6 Associates with Tgn38/41 and Is Involved in Budding of Exocytic Vesicles From the Trans-Golgi Network. *J. Cell Biol.* 122, 775–788. doi:10.1038/ncb1008-1125
- Jones, S.M., Howell, K.E., 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the formation of constitutive transport vesicles from the TGN. *J. Cell Biol.* 139, 339–349. doi:10.1083/jcb.139.2.339
- Jordan, M.B., Hildeman, D., Kappler, J., Marrack, P., 2004. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 104, 735–743. doi:10.1182/blood-2003-10-3413

- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., Neefjes, J., 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* 11, 1680–1685.
- Jung, H.-R., Song, K.H., Chang, J.T., Doh, J., 2014. Geometrically controlled asymmetric division of CD4+ T cells studied by immunological synapse arrays. *PLoS ONE* 9, e91926. doi:10.1371/journal.pone.0091926
- Kabanova, A., Sanseviero, F., Candi, V., Gamberucci, A., Gozzetti, A., Campoccia, G., Bocchia, M., Baldari, C.T., 2016. Human Cytotoxic T Lymphocytes Form Dysfunctional Immune Synapses with B Cells Characterized by Non-Polarized Lytic Granule Release. *Cell Rep* 15, 9–18. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.084
- Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Vardhana, S., Dustin, M.L., Vale, R.D., 2009. The coreceptor CD2 uses plasma membrane microdomains to transduce signals in T cells. *J. Cell Biol.* 185, 521–534. doi:10.1083/jcb.200809136
- Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Varma, R., Dustin, M.L., Vale, R.D., 2007. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20296–20301. doi:10.1073/pnas.0710258105
- Kakinuma, T., Ichikawa, H., Tsukada, Y., Nakamura, T., Toh, B.-H., 2004. Interaction between p230 and MACF1 is associated with transport of a glycosyl phosphatidyl inositol-anchored protein from the Golgi to the cell periphery. *Experimental Cell Research* 298, 388–398. doi:10.1016/j.yexcr.2004.04.047
- Karniguian, A., Zahraoui, A., Tavitian, A., 1993. Identification of Small Gtp-Binding Rab Proteins in Human Platelets - Thrombin-Induced Phosphorylation of Rab3b, Rab6, and Rab8 Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7647–7651.
- Karnitz, L., Sutor, S.L., Torigoe, T., Reed, J.C., Bell, M.P., McKean, D.J., Leibson, P.J., Abraham, R.T., 1992. Effects of p56lck deficiency on the growth and cytolytic effector function of an interleukin-2-dependent cytotoxic T-cell line. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4521–4530.
- Keller, B., Zaidman, I., Yousefi, O.S., Hershkovitz, D., Stein, J., Unger, S., Schachtrup, K., Sigvardsson, M., Kuperman, A.A., Shaag, A., Schamel, W.W., Elpeleg, O., Warnatz, K., Stepensky, P., 2016. Early onset combined immunodeficiency and autoimmunity in patients with loss-of-function mutation in LAT. *J. Exp. Med.* 213, 1185–1199. doi:10.1084/jem.20151110
- Kent, H.M., Kent, H.M., Evans, P.R., Schäfer, I.B., Gray, S.R., Sanderson, C.M., Sanderson, C.M., Luzio, J.P., Peden, A.A., Peden, A.A., Owen, D.J., 2012. Structural Basis of the Intracellular Sorting of the SNARE VAMP7 by the AP3 Adaptor Complex. *Dev Cell* 22, 979–988. doi:10.1016/j.devcel.2012.01.018
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., 2006. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* 8, 191–197. doi:10.1038/ni1428
- Kirsch, K.H., Georgescu, M.M., Shishido, T., Langdon, W.Y., Birge, R.B., Hanafusa, H., 2001. The adapter type protein CMS/CD2AP binds to the proto-oncogenic protein c-Cbl through a tyrosine phosphorylation-regulated Src homology 3 domain interaction. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4957–4963. doi:10.1074/jbc.M005784200
- Klinkert, K., Echard, A., 2016. Rab35 GTPase: A Central Regulator of Phosphoinositides and F-actin in Endocytic Recycling and Beyond. *Traffic*. doi:10.1111/tra.12422
- Klinkert, K., Rocancourt, M., Houdusse, A., Echard, A., 2016. Rab35 GTPase couples cell division with initiation of epithelial apico-basal polarity and lumen opening. *Nat Commun* 7, 11166. doi:10.1038/ncomms11166
- Kobayashi, H., Etoh, K., Ohbayashi, N., Fukuda, M., 2014. Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biol Open* 3, 803–814. doi:10.1242/bio.20148771
- Koonpaew, S., Shen, S., Flowers, L., Zhang, W., 2006. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 203, 119–129. doi:10.1084/jem.20050903
- Koretzky, G.A., Abtahian, F., Silverman, M.A., 2006. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 67–78. doi:10.1038/nri1750
- Kortum, R.L., Balagopalan, L., Alexander, C.P., Garcia, J., Pinski, J.M., Merrill, R.K., Nguyen, P.H., Li, W., Agarwal, I., Akpan, I.O., Sommers, C.L., Samelson, L.E., 2013a. The ability of Sos1 to oligomerize the adaptor protein LAT is separable from its guanine nucleotide exchange activity in vivo. *Sci Signal* 6, ra99–ra99. doi:10.1126/scisignal.2004494
- Kortum, R.L., Rouquette-Jazdanian, A.K., Miyaji, M., Merrill, R.K., Markegard, E., Pinski, J.M., Wesselink, A., Nath, N.N., Alexander, C.P., Li, W., Kedei, N., Roose, J.P., Blumberg, P.M., Samelson, L.E., Sommers, C.L., 2013b. A phospholipase C- γ 1-independent, RasGRP1-ERK-dependent pathway drives lymphoproliferative disease in linker for activation of T cells-Y136F

- mutant mice. *J. Immunol.* 190, 147–158. doi:10.4049/jimmunol.1201458
- Krummel, M.F., Macara, I., 2006. Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat. Immunol.* 7, 1143–1149. doi:10.1038/ni1404
- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Watts, J., Stern, J.N.H., Strominger, J.L., 2011. VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 3323–3329. doi:10.1002/eji.201141582
- Kuhn, J.R., Poenie, M., 2002. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-Mediated killing. *Immunity* 16, 111–121.
- Kuhné, M.R., Lin, J., Yablonski, D., Mollenauer, M.N., Ehrlich, L.I.R., Huppa, J., Davis, M.M., Weiss, A., 2003. Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *The Journal of Immunology* 171, 860–866. doi:10.4049/jimmunol.171.2.860
- Kunii, N., Zhao, Y., Jiang, S., Liu, X., Scholler, J., Balagopalan, L., Samelson, L.E., Milone, M.C., June, C.H., 2013. Enhanced function of redirected human T cells expressing linker for activation of T cells that is resistant to ubiquitylation. *PLoS One* 8, 27–37. doi:10.1089/hum.2012.130
- Kupfer, A., Mosmann, T.R., Kupfer, H., 1991. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 775–779.
- Kurowska, M., Goudin, N., Nehme, N.T., Court, M., Garin, J., Fischer, A., de Saint Basile, G., Ménasché, G., 2012. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood* 119, 3879–3889. doi:10.1182/blood-2011-09-382556
- la Roche, de, M., Asano, Y., Griffiths, G.M., 2016. Origins of the cytolytic synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 421–432. doi:10.1038/nri.2016.54
- la Roche, de, M., Ritter, A.T., Angus, K.L., Dinsmore, C., Earnshaw, C.H., Reiter, J.F., Griffiths, G.M., 2013. Hedgehog signaling controls T cell killing at the immunological synapse. *Science* 342, 1247–1250. doi:10.1126/science.1244689
- Larghi, P., Williamson, D.J., Carpier, J.-M., Dogniaux, S., Chemin, K., Bohineust, A., Danglot, L., Gaus, K., Galli, T., Hivroz, C., 2013. VAMP7 controls T cell activation by regulating the recruitment and phosphorylation of vesicular Lat at TCR-activation sites. *J. Cell Biol.* 199, 723–731. doi:10.1038/ni.2609
- Lasserre, R., Charrin, S., Cucho, C., Danckaert, A., Thoulouze, M.-I., de Chaumont, F., Duong, T., Perrault, N., Varin-Blank, N., Olivo-Marin, J.-C., Etienne-Manneville, S., Arpin, M., Di Bartolo, V., Alcover, A., 2010. Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J.* 29, 2301–2314. doi:10.1038/emboj.2010.127
- Lasserre, R., Cucho, C., Blecher-Gonen, R., Libman, E., Biquand, E., Danckaert, A., Yablonski, D., Alcover, A., Di Bartolo, V., 2011. Release of serine/threonine-phosphorylated adaptors from signaling microclusters down-regulates T cell activation. *J. Cell Biol.* 195, 839–853. doi:10.1083/jcb.201103105
- Lee, K.-H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P.M., Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., Shaw, A.S., 2003. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302, 1218–1222. doi:10.1126/science.1086507
- Lee, K.-H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., Shaw, A.S., 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539–1542. doi:10.1126/science.1067710
- Lee, P.L., Ohlson, M.B., Pfeffer, S.R., 2015. Rab6 regulation of the kinesin family KIF1C motor domain contributes to Golgi tethering. *Elife* 4, 917. doi:10.7554/eLife.06029
- Lesourne, R., Uehara, S., Lee, J., Song, K.-D., Li, L., Pinkhasov, J., Zhang, Y., Weng, N.-P., Wildt, K.F., Wang, L., Bosselut, R., Love, P.E., 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* 10, 840–847. doi:10.1038/ni.1768
- Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U., Simons, K., 2010. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22050–22054. doi:10.1073/pnas.1016184107
- Li, H., Llera, A., Malchiodi, E.L., Mariuzza, R.A., 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 435–466. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.435
- Li, Q.-J., Dinner, A.R., Qi, S., Irvine, D.J., Huppa, J.B., Davis, M.M., Chakraborty, A.K., 2004. CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 5, 791–799. doi:10.1038/ni1095
- Liang, Y., Cucchetti, M., Roncagalli, R., Yokosuka, T., Malzac, A., Bertosio, E., Imbert, J., Nijman, I.J., Suchanek, M., Saito, T., Wülfing, C., Malissen, B., Malissen, M., 2013. The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 14, 858–866. doi:10.1038/ni.2634

- Lieu, Z.Z., Derby, M.C., Teasdale, R.D., Hart, C., Gunn, P., Gleeson, P.A., 2007. The golgin GCC88 is required for efficient retrograde transport of cargo from the early endosomes to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* 18, 4979–4991. doi:10.1091/mbc.E07-06-0622
- Liewen, H., Meinhold-Heerlein, I., Oliveira, V., Schwarzenbacher, R., Luo, G., Wadle, A., Jung, M., Pfreundschuh, M., Stenner-Liewen, F., 2005. Characterization of the human GARP (Golgi associated retrograde protein) complex. *Experimental Cell Research* 306, 24–34. doi:10.1016/j.yexcr.2005.01.022
- Lillemeier, B.F., Mörtelmaier, M.A., Forstner, M.B., Huppa, J.B., Groves, J.T., Davis, M.M., 2010. TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nat. Immunol.* 11, 90–96. doi:10.1038/ni.1832
- Lillemeier, B.F., Pfeiffer, J.R., Surviladze, Z., Wilson, B.S., Davis, M.M., 2006. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18992–18997. doi:10.1073/pnas.0609009103
- Lin, J., Hou, K.K., Piwnica-Worms, H., Shaw, A.S., 2009. The polarity protein Par1b/EMK/MARK2 regulates T cell receptor-induced microtubule-organizing center polarization. *J. Immunol.* 183, 1215–1221. doi:10.4049/jimmunol.0803887
- Lin, J., Weiss, A., 2001. Identification of the minimal tyrosine residues required for linker for activation of T cell function. *Journal of Biological Chemistry* 276, 29588–29595. doi:10.1074/jbc.M102221200
- Lindsay, A.J., Jollivet, F., Horgan, C.P., Khan, A.R., Raposo, G., McCaffrey, M.W., Goud, B., 2013. Identification and characterization of multiple novel Rab-myosin Va interactions. *Mol. Biol. Cell* 24, 3420–3434. doi:10.1091/mbc.E13-05-0236
- Liu, D., Bryceson, Y.T., Meckel, T., Vasiliver-Shamis, G., Dustin, M.L., Long, E.O., 2009. Integrin-dependent organization and bidirectional vesicular traffic at cytotoxic immune synapses. *Immunity* 31, 99–109. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.009
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D.L., Vignali, D.A., 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13, 665–675.
- Liu, S.K., Fang, N., Koretzky, G.A., McGlade, C.J., 1999. The hematopoietic-specific adaptor protein Gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol.* 9, 67–75.
- Liu, X., Kapoor, T.M., Chen, J.K., Huse, M., 2013. Diacylglycerol promotes centrosome polarization in T cells via reciprocal localization of dynein and myosin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 11976–11981. doi:10.1073/pnas.1306180110
- Llewelyn, M., Sriskandan, S., Terrazzini, N., Cohen, J., Altmann, D.M., 2006. The TCR Vbeta signature of bacterial superantigens spreads with stimulus strength. *Int. Immunol.* 18, 1433–1441. doi:10.1093/intimm/dxl076
- Lock, J.G., Hammond, L.A., Houghton, F., Gleeson, P.A., Stow, J.L., 2005. E-cadherin transport from the trans-Golgi network in tubulovesicular carriers is selectively regulated by golgin-97. *Traffic* 6, 1142–1156. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00349.x
- Loftus, S.K., Larson, D.M., Baxter, L.L., Antonellis, A., Chen, Y., Wu, X., Jiang, Y., Bittner, M., Hammer, J.A., Pavan, W.J., 2002. Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4471–4476. doi:10.1073/pnas.072087599
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M.A., Goda, Y., Zerial, M., Pfeffer, S.R., 1993. Rab9 Functions in Transport Between Late Endosomes and the Trans Golgi Network. *EMBO J.* 12, 677–682.
- Loo, L.S., Hwang, L.-A., Ong, Y.M., Tay, H.S., Wang, C.-C., Hong, W., 2009. A role for endobrevin/VAMP8 in CTL lytic granule exocytosis. *Eur. J. Immunol.* 39, 3520–3528. doi:10.1002/eji.200939378
- Lou, J., Rossy, J., Deng, Q., Pigeon, S.V., Gaus, K., 2016. New Insights into How Trafficking Regulates T Cell Receptor Signaling. *Front Cell Dev Biol* 4, 77. doi:10.3389/fcell.2016.00077
- Lowin-Kropf, B., Shapiro, V.S., Weiss, A., 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* 140, 861–871.
- Ludford-Menting, M.J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E.T.Y., Pedersen, N., Thomas, S.J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L.E., Waterhouse, N.J., Murphy, A., Ellis, S., Smyth, M.J., Kershaw, M.H., Darcy, P.K., Humbert, P.O., Russell, S.M., 2005. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22, 737–748. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.009
- Macara, I.G., 2004. Parsing the polarity code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 220–231. doi:10.1038/nrm1332
- Mai, A., Veltel, S., Pellinen, T., Padzik, A., Coffey, E., Marjomäki, V., Ivaska, J., 2011. Competitive binding of Rab21 and p120RasGAP to integrins regulates receptor traffic and migration. *J Cell Biol* 194, 291–306. doi:10.1083/jcb.201012126
- Maldonado, R.A., Irvine, D.J., Schreiber, R., Glimcher, L.H., 2004. A role for the immunological synapse

- in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* 431, 527–532. doi:10.1038/nature02916
- Maldonado, R.A., Soriano, M.A., Perdomo, L.C., Sigrist, K., Irvine, D.J., Decker, T., Glimcher, L.H., 2009. Control of T helper cell differentiation through cytokine receptor inclusion in the immunological synapse. *J. Exp. Med.* 206, 877–892. doi:10.1084/jem.20082900
- Malissen, B., Aguado, E., Malissen, M., 2005. Role of the LAT adaptor in T-cell development and Th2 differentiation. *Adv. Immunol.* 87, 1–25. doi:10.1016/S0065-2776(05)87001-4
- Malissen, B., Grégoire, C., Malissen, M., Roncagalli, R., 2014. Integrative biology of T cell activation. *Nat. Immunol.* 15, 790–797. doi:10.1038/ni.2959
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., SALAMERO, J., Goud, B., Johannes, L., 1998. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol.* 143, 973–990.
- Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B., Johannes, L., 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* 156, 653–664. doi:10.1083/jcb.200110081
- Mandl, J.N., Mandl, J.N., Monteiro, J.P., Monteiro, J.P., Vriskoop, N., Vriskoop, N., Germain, R.N., Germain, R.N., 2013. T Cell-Positive Selection Uses Self-Ligand Binding Strength to Optimize Repertoire Recognition of Foreign Antigens. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.011
- Manz, B.N., Jackson, B.L., Petit, R.S., Dustin, M.L., Groves, J., 2011. T-cell triggering thresholds are modulated by the number of antigen within individual T-cell receptor clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9089–9094. doi:10.1073/pnas.1018771108
- Marek-Bukowiec, K., Aguado, E., Miazek, A., 2016. Phorbol ester-mediated re-expression of endogenous LAT adapter in JCaM2 cells: a model for dissecting drivers and blockers of LAT transcription. *Genes Immun.* 17, 313–320. doi:10.1038/gene.2016.25
- Marshall, M.R., Pattu, V., Halimani, M., Maier-Peuschel, M., Müller, M.-L., Becherer, U., Hong, W., Hoth, M., Tschernig, T., Bryceson, Y.T., Rettig, J., 2015. VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J. Cell Biol.* 210, 135–151. doi:10.1083/jcb.201411093
- Martinez, O., SCHMIDT, A., SALAMERO, J., HOFLACK, B., Roa, M., Goud, B., 1994. The Small Gtp-Binding Protein Rab6 Functions in Intra-Golgi Transport. *J Cell Biol* 127, 1575–1588.
- Martinez-Arca, S., Alberts, P., Zahraoui, A., Louvard, D., Galli, T., 2000. Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* 149, 889–899.
- Martinez-Arca, S., Coco, S., Mainguy, G., Schenk, U., Alberts, P., Bouille, P., Mezzina, M., Prochiantz, A., Matteoli, M., Louvard, D., Galli, T., 2001. A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J. Neurosci.* 21, 3830–3838.
- Martinez-Arca, S., Martinez-Arca, S., Rudge, R., Vacca, M., Raposo, G., Raposo, G., Camonis, J., Camonis, J., Proux-Gillardeaux, V., Daviet, L., Daviet, L., Formstecher, E., Hamburger, A., Hamburger, A., Filippini, F., D'Esposito, M., Galli, T., 2003a. A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9011–9016. doi:10.1073/pnas.1431910100
- Martinez-Arca, S., Rudge, R., Vacca, M., Raposo, G., Camonis, J., Proux-Gillardeaux, V., Daviet, L., Formstecher, E., Hamburger, A., Filippini, F., D'Esposito, M., Galli, T., 2003b. A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9011–9016. doi:10.1073/pnas.1431910100
- Martín-Cófreces, N.B., Baixauli, F., López, M.J., Gil, D., Monjas, A., Alarcón, B., Sanchez-Madrid, F., 2012. End-binding protein 1 controls signal propagation from the T cell receptor. *EMBO J.* 31, 4140–4152. doi:10.1038/emboj.2012.242
- Martín-Cófreces, N.B., Baixauli, F., Sanchez-Madrid, F., 2014. Immune synapse: conductor of orchestrated organelle movement. *Trends Cell Biol.* 24, 61–72. doi:10.1016/j.tcb.2013.09.005
- Martín-Cófreces, N.B., Robles-Valero, J., Cabrero, J.R., Mittelbrunn, M., Gordón-Alonso, M., Sung, C.-H., Alarcón, B., Vázquez, J., Sanchez-Madrid, F., 2008. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J. Cell Biol.* 182, 951–962. doi:10.1083/jcb.200801014
- Martínez-Martín, N., Fernández-Arenas, E., Cemerski, S., Delgado, P., Turner, M., Heuser, J., Irvine, D.J., Huang, B., Bustelo, X.R., Shaw, A., Alarcón, B., 2011. T cell receptor internalization from the immunological synapse is mediated by TC21 and RhoG GTPase-dependent phagocytosis. *Immunity* 35, 208–222. doi:10.1016/j.immuni.2011.06.003
- Matsuda, S., Miwa, Y., Hirata, Y., Minowa, A., Tanaka, J., Nishida, E., Koyasu, S., 2004. Negative feedback loop in T-cell activation through MAPK-catalyzed threonine phosphorylation of LAT. *EMBO J.* 23, 2577–2585. doi:10.1038/sj.emboj.7600268

- Matsuto, M., Kano, F., Murata, M., 2015. Reconstitution of the targeting of Rab6A to the Golgi apparatus in semi-intact HeLa cells: A role of BICD2 in stabilizing Rab6A on Golgi membranes and a concerted role of Rab6A/BICD2 interactions in Golgi-to-ER retrograde transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2592–2609. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.005
- Mayer, T., Touchot, N., Elazar, Z., 1996. Transport between cis and medial Golgi cisternae requires the function of the Ras-related protein Rab6. *Journal of Biological Chemistry* 271, 16097–16103.
- McCarl, C.-A., Picard, C., Khalil, S., Kawasaki, T., Röther, J., Papolos, A., Kutok, J., Hivroz, C., LeDeist, F., Plogmann, K., Ehl, S., Notheis, G., Albert, M.H., Belohradsky, B.H., Kirschner, J., Rao, A., Fischer, A., Feske, S., 2009. ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca²⁺ entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 1311–1318.e7. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.007
- McGough, I.J., Steinberg, F., Jia, D., Barbuti, P.A., McMillan, K.J., Heesom, K.J., Whone, A.L., Caldwell, M.A., Billadeau, D.D., Rosen, M.K., Cullen, P.J., 2014. Retromer binding to FAM21 and the WASH complex is perturbed by the Parkinson disease-linked VPS35(D620N) mutation. *Curr. Biol.* 24, 1670–1676. doi:10.1016/j.cub.2014.06.024
- McMahon, H.T., Ushkaryov, Y.A., Edelmann, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R., Südhof, T.C., 1993. Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 364, 346–349. doi:10.1038/364346a0
- McNeill, L., Salmond, R.J., Cooper, J.C., Carret, C.K., Cassady-Cain, R.L., Roche-Molina, M., Tandon, P., Holmes, N., Alexander, D.R., 2007. The Differential Regulation of Lck Kinase Phosphorylation Sites by CD45 Is Critical for T Cell Receptor Signaling Responses. *Immunity* 27, 425–437. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.015
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., Figura, von, K., Schu, P., 2000. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J.* 19, 2193–2203. doi:10.1093/emboj/19.10.2193
- Ménager, M.M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.-H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A., de Saint Basile, G., 2007. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat. Immunol.* 8, 257–267. doi:10.1038/ni1431
- Ménasché, G., Ménager, M.M., Lefebvre, J.M., Deutsch, E., Athman, R., Lambert, N., Mahlaoui, N., Court, M., Garin, J., Fischer, A., de Saint Basile, G., 2008. A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates to cytotoxic granule secretion. *Blood* 112, 5052–5062. doi:10.1182/blood-2008-02-141069
- Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., de Saint Basile, G., 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25, 173–176. doi:10.1038/76024
- Micaroni, M., Stanley, A.C., Khromykh, T., Venturato, J., Wong, C.X.F., Lim, J.P., Marsh, B.J., Storrie, B., Gleeson, P.A., Stow, J.L., 2013. Rab6a/a' are important Golgi regulators of pro-inflammatory TNF secretion in macrophages. *PLoS ONE* 8, e57034. doi:10.1371/journal.pone.0057034
- Mingueneau, M., Roncagalli, R., Grégoire, C., Kissenpfennig, A., Miazek, A., Archambaud, C., Wang, Y., Perrin, P., Bertosio, E., Sansoni, A., Richelme, S., Locksley, R.M., Aguado, E., Malissen, M., Malissen, B., 2009. Loss of the LAT adaptor converts antigen-responsive T cells into pathogenic effectors that function independently of the T cell receptor. *Immunity* 31, 197–208. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.013
- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B., Echard, A., 2010. Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 12, 645–654. doi:10.1038/ncb2067
- Miserey-Lenkei, S., Waharte, F., Boulet, A., Cuif, M.-H., Tenza, D., Marjou, El, A., Raposo, G., Salamero, J., Héliot, L., Goud, B., Monier, S., 2007. Rab6-interacting protein 1 links Rab6 and Rab11 function. *8*, 1385–1403. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00612.x
- Monier, S., Jollivet, F., Janoueix-Lerosey, I., Johannes, L., Goud, B., 2002. Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic* 3, 289–297.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A., 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86. doi:10.1038/25764
- Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., Kupfer, A., 1997. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 385, 83–86. doi:10.1038/385083a0
- Montanaro, L., Sperti, S., Stirpe, F., 1973. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem. J.* 136, 677–683.
- Mor, A., Phillips, M.R., 2006. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 771–800. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090723
- Moreau, H.D., Lemaître, F., Terriac, E., Azar, G., Piel, M., Lennon-Duménil, A.-M., Bousso, P., 2012.

- Dynamic in situ cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses in vivo. *Immunity* 37, 351–363. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.014
- Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., Rubinsztein, D.C., 2011. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell* 146, 303–317. doi:10.1016/j.cell.2011.06.023
- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N.J., Robinson, M.S., 2003. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 162, 909–918. doi:10.1083/jcb.200305145
- Muhammad, A., Flores, I., Zhang, H., Yu, R., Staniszewski, A., Planel, E., Herman, M., Ho, L., Kreber, R., Honig, L.S., Ganetzky, B., Duff, K., Arancio, O., Small, S.A., 2008. Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and Abeta accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7327–7332. doi:10.1073/pnas.0802545105
- Müller, A.J., Filipe-Santos, O., Eberl, G., Aebischer, T., Späth, G.F., Bousso, P., 2012. CD4+ T cells rely on a cytokine gradient to control intracellular pathogens beyond sites of antigen presentation. *Immunity* 37, 147–157. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.015
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E.A., Mayer, T.U., Barr, F.A., 2003. Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* 162, 863–875. doi:10.1083/jcb.200306009
- Neeft, M., Wieffer, M., de Jong, A.S., Negroiu, G., Metz, C.H.G., van Loon, A., Griffith, J., Krijgsveld, J., Wulffraat, N., Koch, H., Heck, A.J.R., Brose, N., Kleijmeer, M., van der Sluijs, P., 2005. Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 731–741. doi:10.1091/mbc.E04-10-0923
- Nielsen, M.S., Gustafsen, C., Madsen, P., Nyengaard, J.R., Hermeijer, G., Bakke, O., Mari, M., Schu, P., Pohlmann, R., Dennes, A., Petersen, C.M., 2007. Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6842–6851. doi:10.1128/MCB.00815-07
- Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Höfer, T., Viola, A., Acuto, O., 2010. Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* 32, 766–777. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.011
- Norcross, M.A., 1984. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann. Immunol. (Paris)* 135D, 113–134.
- Nothwehr, S.F., Ha, S.A., Bruinsma, P., 2000. Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J Cell Biol* 151, 297–310.
- Ohbayashi, N., Yatsu, A., Tamura, K., Fukuda, M., 2012. The Rab21-GEF activity of Varp, but not its Rab32/38 effector function, is required for dendrite formation in melanocytes. *Mol. Biol. Cell* 23, 669–678. doi:10.1091/mbc.E11-04-0324
- Onnis, A., Finetti, F., Baldari, C.T., 2016. Vesicular Trafficking to the Immune Synapse: How to Assemble Receptor-Tailored Pathways from a Basic Building Set. *Front Immunol* 7, 50. doi:10.3389/fimmu.2016.00050
- Onnis, A., Finetti, F., Patrussi, L., Gottardo, M., Cassioli, C., Spanò, S., Baldari, C.T., 2015. The small GTPase Rab29 is a common regulator of immune synapse assembly and ciliogenesis. *Cell Death Differ.* 22, 1687–1699. doi:10.1038/cdd.2015.17
- Opdam, F., Echard, A., Croes, H., van den Hurk, J., van de Vorstenbosch, R.A., Ginsel, L.A., Goud, B., Fransen, J., 2000. The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. *J. Cell. Sci.* 113, 2725–2735.
- Osborne, D.G., Piotrowski, J.T., Dick, C.J., Zhang, J.-S., Billadeau, D.D., 2015. SNX17 affects T cell activation by regulating TCR and integrin recycling. *J. Immunol.* 194, 4555–4566. doi:10.4049/jimmunol.1402734
- Palacios, E.H., Weiss, A., 2004. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23, 7990–8000. doi:10.1038/sj.onc.1208074
- Paster, W., Brockmeyer, C., Fu, G., Simister, P.C., de Wet, B., Martinez-Riaño, A., Hoerter, J.A.H., Feller, S.M., Wülfing, C., Gascoigne, N.R.J., Acuto, O., 2013. GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J. Immunol.* 190, 3749–3756. doi:10.4049/jimmunol.1203389
- Patino-Lopez, G., Dong, X., Ben-Aissa, K., Bernot, K.M., Itoh, T., Fukuda, M., Kruhlak, M.J., Samelson, L.E., Shaw, S., 2008. Rab35 and its GAP EPI64C in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 18323–18330. doi:10.1074/jbc.M800056200
- Paul, S., Schaefer, B.C., 2013. A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor- κ B. *Trends Immunol.* 34, 269–281. doi:10.1016/j.it.2013.02.002

- Pérez-Victoria, F.J., Bonifacino, J.S., 2009. Dual roles of the mammalian GARP complex in tethering and SNARE complex assembly at the trans-golgi network. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5251–5263. doi:10.1128/MCB.00495-09
- Pérez-Victoria, F.J., Mardones, G.A., Bonifacino, J.S., 2008. Requirement of the human GARP complex for mannose 6-phosphate-receptor-dependent sorting of cathepsin D to lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 19, 2350–2362. doi:10.1091/mbc.E07-11-1189
- Pfeffer, S.R., 2011. Entry at the trans-face of the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. doi:10.1101/cshperspect.a005272
- Picard, C., McCarl, C.-A., Papolos, A., Khalil, S., Lüthy, K., Hivroz, C., LeDeist, F., Rieux-Laucat, F., Rechavi, G., Rao, A., Fischer, A., Feske, S., 2009. STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* 360, 1971–1980. doi:10.1056/NEJMoa0900082
- Piotrowski, J.T., Gomez, T.S., Schoon, R.A., Mangalam, A.K., Billadeau, D.D., 2013. WASH knockout T cells demonstrate defective receptor trafficking, proliferation, and effector function. *Mol. Cell. Biol.* 33, 958–973. doi:10.1128/MCB.01288-12
- Pocha, S.M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B., Knust, E., 2011. Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr. Biol.* 21, 1111–1117. doi:10.1016/j.cub.2011.05.007
- Popoff, V., Mardones, G.A., Bai, S.-K., Chambon, V., Tenza, D., Burgos, P.V., Shi, A., Benaroch, P., Urbé, S., Lamaze, C., Grant, B.D., Raposo, G., Johannes, L., 2009. Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. *Traffic* 10, 1868–1880. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00993.x
- Popoff, V., Mardones, G.A., Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacino, J.S., Raposo, G., Johannes, L., 2007. The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *J. Cell. Sci.* 120, 2022–2031. doi:10.1242/jcs.003020
- Powelka, A.M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L.M., Sonnenberg, A., Hsu, V.W., 2004. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* 5, 20–36. doi:10.1046/j.1600-0854.2003.00150.x
- Pryor, P.R., Jackson, L., Gray, S.R., Edeling, M.A., Thompson, A., Sanderson, C.M., Evans, P.R., Owen, D.J., Luzio, J.P., 2008. Molecular Basis for the Sorting of the SNARE VAMP7 into Endocytic Clathrin-Coated Vesicles by the ArfGAP Hrb. *Cell* 134, 817–827. doi:10.1016/j.cell.2008.07.023
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Lindsay, M.R., Gray, S.R., Richardson, S.C.W., Stewart, A., James, D.E., Piper, R.C., Luzio, J.P., 2004. Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep.* 5, 590–595. doi:10.1038/sj.embor.7400150
- Purbhoo, M.A., Liu, H., Oddos, S., Owen, D.M., Neil, M.A.A., Pagoon, S.V., French, P.M.W., Rudd, C.E., Davis, D.M., 2010. Dynamics of subsynaptic vesicles and surface microclusters at the immunological synapse. *Sci Signal* 3, ra36–ra36. doi:10.1126/scisignal.2000645
- Quann, E.J., Liu, X., Altan-Bonnet, G., Huse, M., 2011. A cascade of protein kinase C isozymes promotes cytoskeletal polarization in T cells. *Nat. Immunol.* 12, 647–654. doi:10.1038/ni.2033
- Quann, E.J., Merino, E., Furuta, T., Huse, M., 2009. Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat. Immunol.* 10, 627–635. doi:10.1038/ni.1734
- Racchetti, G., Lorusso, A., Schulte, C., Gavello, D., Carabelli, V., D'Alessandro, R., Meldolesi, J., 2010. Rapid neurite outgrowth in neurosecretory cells and neurons is sustained by the exocytosis of a cytoplasmic organelle, the enlargeosome. *J. Cell. Sci.* 123, 165–170. doi:10.1242/jcs.059634
- Rahajeng, J., Giridharan, S.S.P., Cai, B., Naslavsky, N., Caplan, S., 2012. MICAL-L1 is a tubular endosomal membrane hub that connects Rab35 and Arf6 with Rab8a. *Traffic* 13, 82–93. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01294.x
- Randhawa, V.K., Thong, F.S.L., Lim, D.Y., Li, D., Garg, R.R., Rudge, R., Galli, T., Rudich, A., Klip, A., 2004. Insulin and hypertonicity recruit GLUT4 to the plasma membrane of muscle cells by using N-ethylmaleimide-sensitive factor-dependent SNARE mechanisms but different v-SNAREs: role of TI-VAMP. *Mol. Biol. Cell* 15, 5565–5573. doi:10.1091/mbc.E04-03-0266
- Rao, S.K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Andrews, N.W., 2004a. Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 20471–20479. doi:10.1074/jbc.M400798200
- Rao, S.K., Rao, S.K., Huynh, C., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Andrews, N.W., Andrews, N.W., 2004b. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 20471–20479. doi:10.1074/jbc.M400798200
- Real, E., Faure, S., Donnadiou, E., Delon, J., 2007. Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. *The Journal of Immunology* 179, 5649–5652.

doi:10.4049/jimmunol.179.9.5649

- Recacha, R., Boulet, A., Jollivet, F., Monier, S., Houdusse, A., Goud, B., Khan, A.R., 2009. Structural basis for recruitment of Rab6-interacting protein 1 to Golgi via a RUN domain. *Structure* 17, 21–30. doi:10.1016/j.str.2008.10.014
- Reddy, J.V., Burguete, A.S., Sridevi, K., Ganley, I.G., Nottingham, R.M., Pfeffer, S.R., 2006. A functional role for the GCC185 golgin in mannose 6-phosphate receptor recycling. *Mol. Biol. Cell* 17, 4353–4363. doi:10.1091/mbc.E06-02-0153
- Riederer, M.A., Soldati, T., Shapiro, A.D., Lin, J., Pfeffer, S.R., 1994. Lysosome Biogenesis Requires Rab9 Function and Receptor Recycling From Endosomes to the Trans-Golgi Network. *J Cell Biol* 125, 573–582.
- Rincón, M., Flavell, R.A., Davis, R.J., 2001. Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* 20, 2490–2497. doi:10.1038/sj.onc.1204382
- Roa, M., Cornet, V., Yang, C.Z., Goud, B., 1993. The small GTP-binding protein rab6p is redistributed in the cytosol by brefeldin A. *J. Cell. Sci.* 106 (Pt 3), 789–802.
- Robertson, J.M., Jensen, P.E., Evavold, B.D., 2000. DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope. *The Journal of Immunology* 164, 4706–4712. doi:10.4049/jimmunol.164.9.4706
- Rodriguez-Peña, A.B., Gomez-Rodriguez, J., Kortum, R.L., Palmer, D.C., Yu, Z., Guittard, G.C., Wohlfert, E.A., Silver, P.B., Mispion, J.A., Sommers, C.L., Feigenbaum, L., Epstein, S.L., Caspi, R.R., Belkaid, Y., Restifo, N.P., Samelson, L.E., Balagopalan, L., 2015. Enhanced T-cell activation and differentiation in lymphocytes from transgenic mice expressing ubiquitination-resistant 2KR LAT molecules. *Gene Ther.* 22, 781–792. doi:10.1038/gt.2015.48
- Rojas, R., Kametaka, S., Haft, C.R., Bonifacino, J.S., 2007. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1112–1124. doi:10.1128/MCB.00156-06
- Roncagalli, R., Hauri, S., Fiore, F., Liang, Y., Chen, Z., Sansoni, A., Kanduri, K., Joly, R., Malzac, A., Lähdesmäki, H., Lahesmaa, R., Yamasaki, S., Saito, T., Malissen, M., Aebersold, R., Gstaiger, M., Malissen, B., 2014. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat. Immunol.* 15, 384–392. doi:10.1038/ni.2843
- Rossi, V., Banfield, D.K., Vacca, M., Dietrich, L.E.P., Ungermann, C., D'Esposito, M., Galli, T., Filippini, F., 2004. Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators. *Trends Biochem. Sci.* 29, 682–688. doi:10.1016/j.tibs.2004.10.002
- Rosy, J., Owen, D.M., Williamson, D.J., Yang, Z., Gaus, K., 2013a. Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nat. Immunol.* 14, 82–89. doi:10.1038/ni.2488
- Rosy, J., Pigeon, S.V., Davis, D.M., Gaus, K., 2013b. Super-resolution microscopy of the immunological synapse. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 307–312. doi:10.1016/j.coi.2013.04.002
- Rothenberg, E.V., Moore, J.E., Yui, M.A., 2008. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 9–21. doi:10.1038/nri2232
- Rouquette-Jazdanian, A.K., Sommers, C.L., Kortum, R.L., Morrison, D.K., Samelson, L.E., 2012. LAT-Independent Erk Activation via Bam32-PLC- γ -1-Pak1 Complexes: GTPase-Independent Pak1 Activation. *Molecular Cell* 48, 298–312. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.011
- Sahlender, D.A., Kozik, P., Miller, S.E., Peden, A.A., Robinson, M.S., 2013. Uncoupling the Functions of CALM in VAMP Sorting and Clathrin-Coated Pit Formation. *PLoS ONE* 8, e64514. doi:10.1371/journal.pone.0064514
- Saint-Pol, A., Yéamos, B., Amessou, M., Mills, I.G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H.T., Lamaze, C., Johannes, L., 2004. Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell* 6, 525–538.
- Saitoh, S., Arudchandran, R., Manetz, T.S., Zhang, W., Sommers, C.L., Love, P.E., Rivera, J., Samelson, L.E., 2000. LAT is essential for Fc(ϵ)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* 12, 525–535.
- Salmerón, A., Borroto, A., Fresno, M., Crumpton, M.J., Ley, S.C., Alarcon, B., 1995. Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain. *The Journal of Immunology* 154, 1675–1683.
- Sander, L.E., Frank, S.P.C., Bolat, S., Blank, U., Galli, T., Bigalke, H., Bischoff, S.C., Lorentz, A., 2008. Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 855–863. doi:10.1002/eji.200737634
- Sanderson, C.J., Glauert, A.M., 1979. Mechanism of T-Cell Mediated Cytotoxicity .6. T-Cell Projections and Their Role in Target-Cell Killing. *Immunology* 36, 119–129.

- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J.V., Hansen, S.H., Vandeurs, B., 1992. Retrograde Transport of Endocytosed Shiga Toxin to the Endoplasmic-Reticulum. *Nature* 358, 510–512. doi:10.1038/358510a0
- Schamel, W.W.A., Arechaga, I., Risueño, R.M., van Santen, H.M., Cabezas, P., Risco, C., Valpuesta, J.M., Alarcón, B., 2005. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J. Exp. Med.* 202, 493–503. doi:10.1084/jem.20042155
- Schäfer, I.B., Schäfer, I.B., Hesketh, G.G., Hesketh, G.G., Bright, N.A., Bright, N.A., Gray, S.R., Gray, S.R., Pryor, P.R., Pryor, P.R., Evans, P.R., Evans, P.R., Luzio, J.P., Luzio, J.P., Owen, D.J., Owen, D.J., 2012. The binding of Varp to VAMP7 traps VAMP7 in a closed, fusogenically inactive conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* doi:10.1038/nsmb.2414
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schlager, M.A., Kapitein, L.C., Grigoriev, I., Burzynski, G.M., Wulf, P.S., Keijzer, N., de Graaff, E., Fukuda, M., Shepherd, I.T., Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., 2010. Pericentrosomal targeting of Rab6 secretory vesicles by Bicaudal-D-related protein 1 (BICDR-1) regulates neuriteogenesis. *EMBO J.* 29, 1637–1651. doi:10.1038/emboj.2010.51
- Schmedt, C., Saijo, K., Niidome, T., Kühn, R., Aizawa, S., Tarakhovsky, A., 1998. Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. *Nature* 394, 901–904. doi:10.1038/29802
- Schmedt, C., Tarakhovsky, A., 2001. Autonomous maturation of alpha/beta T lineage cells in the absence of COOH-terminal Src kinase (Csk). *J. Exp. Med.* 193, 815–826.
- Schmoranzer, J., Fawcett, J.P., Segura, M., Tan, S., Vallee, R.B., Pawson, T., Gundersen, G.G., 2009. Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Curr. Biol.* 19, 1065–1074. doi:10.1016/j.cub.2009.05.065
- Schneider, U., Schwenk, H.U., Bornkamm, G., 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621–626.
- Schoenborn, J.R., Tan, Y.X., Zhang, C., Shokat, K.M., Weiss, A., 2011. Feedback circuits monitor and adjust basal Lck-dependent events in T cell receptor signaling. *Sci Signal* 4, ra59–ra59. doi:10.1126/scisignal.2001893
- Seaman, M.N.J., 2007. Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J. Cell. Sci.* 120, 2378–2389. doi:10.1242/jcs.009654
- Seaman, M.N.J., 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* 165, 111–122. doi:10.1083/jcb.200312034
- Secrist, J.P., Burns, L.A., Karnitz, L., Koretzky, G.A., Abraham, R.T., 1993. Stimulatory Effects of the Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor, Pervanadate, on T-Cell Activation Events. *Journal of Biological Chemistry* 268, 5886–5893.
- Sengupta, P., Satpute-Krishnan, P., Seo, A.Y., Burnette, D.T., Patterson, G.H., Lippincott-Schwartz, J., 2015. ER trapping reveals Golgi enzymes continually revisit the ER through a recycling pathway that controls Golgi organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E6752–61. doi:10.1073/pnas.1520957112
- Sepulveda, F.E., Debeurme, F., Ménasché, G., Kurowska, M., Côte, M., Pachlopnik Schmid, J., Fischer, A., de Saint Basile, G., 2013. Distinct severity of HLH in both human and murine mutants with complete loss of cytotoxic effector PRF1, RAB27A, and STX11. *Blood* 121, 595–603. doi:10.1182/blood-2012-07-440339
- Shafaq-Zadah, M., Gomes-Santos, C.S., Bardin, S., Maiuri, P., Maurin, M., Iranzo, J., Gautreau, A., Lamaze, C., Caswell, P., Goud, B., Johannes, L., 2015. Persistent cell migration and adhesion rely on retrograde transport of β 1 integrin. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/ncb3287
- Shan, X., Czar, M.J., Bunnell, S.C., Liu, P., Liu, Y., Schwartzberg, P.L., Wange, R.L., 2000. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6945–6957.
- Shen, S., Shen, S., Chuck, M.I., Chuck, M.I., Zhu, M., Zhu, M., Fuller, D.M., Fuller, D.M., Yang, C.-W.O., Yang, C.-W.O., Zhang, W., Zhang, W., 2010. The importance of LAT in the activation, homeostasis, and regulatory function of T cells. *J. Biol. Chem.* 285, 35393–35405. doi:10.1074/jbc.M110.145052
- Shen, S., Zhu, M., Lau, J., Chuck, M., Zhang, W., 2009. The essential role of LAT in thymocyte development during transition from the double-positive to single-positive stage. *J. Immunol.* 182, 5596–5604. doi:10.4049/jimmunol.0803170
- Sherman, E., Barr, V., Manley, S., Patterson, G., Balagopalan, L., Akpan, I., Regan, C.K., Merrill, R.K.,

- Sommers, C.L., Lippincott-Schwartz, J., Samelson, L.E., 2011. Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor. *Immunity* 35, 705–720. doi:10.1016/j.immuni.2011.10.004
- Shibata, S., Kawanai, T., Hara, T., Yamamoto, A., Chaya, T., Tokuhara, Y., Tsuji, C., Sakai, M., Tachibana, T., Inagaki, S., 2016. ARHGEF10 directs the localization of Rab8 to Rab6-positive executive vesicles. *J. Cell. Sci.* 129, 3620–3634. doi:10.1242/jcs.186817
- Singleton, K.L., Gosh, M., Dandekar, R.D., Au-Yeung, B.B., Ksionda, O., Tybulewicz, V.L.J., Altman, A., Fowell, D.J., Wuelfing, C., 2011. Itk Controls the Spatiotemporal Organization of T Cell Activation. *Sci Signal* 4, –ra66. doi:10.1126/scisignal.2001821
- Singleton, K.L., Roybal, K.T., Sun, Y., Fu, G., Gascoigne, N.R.J., van Oers, N.S.C., Wülfing, C., 2009. Spatiotemporal patterning during T cell activation is highly diverse. *Sci Signal* 2, ra15–ra15. doi:10.1126/scisignal.2000199
- Sinka, R., Gillingham, A.K., Kondylis, V., Munro, S., 2008. Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for Rab family G proteins. *J. Cell Biol.* 183, 607–615. doi:10.1083/jcb.200808018
- Slot, J.W., Geuze, H.J., 2007. Cryosectioning and immunolabeling. *Nat. Protocols* 2, 2480–2491. doi:10.1038/nprot.2007.365
- Small, S.A., Gandy, S., 2006. Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron* 52, 15–31. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.001
- Small, S.A., Kent, K., Pierce, A., Leung, C., Kang, M.S., Okada, H., Honig, L., Vonsattel, J.-P., Kim, T.-W., 2005. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 58, 909–919. doi:10.1002/ana.20667
- Smith, J.A., Tso, J.Y., Clark, M.R., Cole, M.S., Bluestone, J.A., 1997. Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J. Exp. Med.* 185, 1413–1422.
- Soares, H., Henriques, R., Sachse, M., Ventimiglia, L., Alonso, M.A., Zimmer, C., Thoulouze, M.-I., Alcover, A., 2013a. Regulated vesicle fusion generates signaling nanoterritories that control T cell activation at the immunological synapse. *J. Exp. Med.* 210, 2415–2433. doi:10.1084/jem.20130150
- Soares, H., Lasserre, R., Alcover, A., 2013b. Orchestrating cytoskeleton and intracellular vesicle traffic to build functional immunological synapses. *Immunol. Rev.* 256, 118–132. doi:10.1111/immr.12110
- Sommers, C.L., Lee, J., Steiner, K.L., Gurson, J.M., DePersis, C.L., El-Khoury, D., Fuller, C.L., Shores, E.W., Love, P.E., Samelson, L.E., 2005. Mutation of the phospholipase C-gamma1-binding site of LAT affects both positive and negative thymocyte selection. *J. Exp. Med.* 201, 1125–1134. doi:10.1084/jem.20041869
- Sommers, C.L., Park, C.-S., Lee, J., Feng, C., Fuller, C.L., Grinberg, A., Hildebrand, J.A., Lacaná, E., Menon, R.K., Shores, E.W., Samelson, L.E., Love, P.E., 2002. A LAT mutation that inhibits T cell development yet induces lymphoproliferation. *Science* 296, 2040–2043. doi:10.1126/science.1069066
- Souza, A.C., Machado, F.S., Celes, M.R.N., Faria, G., Rocha, L.B., Silva, J.S., Rossi, M.A., 2005. Mitochondrial damage as an early event of monensin-induced cell injury in cultured fibroblasts L929. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52, 230–237. doi:10.1111/j.1439-0442.2005.00728.x
- Sperling, A.I., Sedy, J.R., Manjunath, N., Kupfer, A., Ardman, B., Burkhardt, J.K., 1998. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *The Journal of Immunology* 161, 6459–6462.
- Stadt, Zur, U., Rohr, J., Seifert, W., Koch, F., Grieve, S., Pagel, J., Strauss, J., Kasper, B., Nürnberg, G., Becker, C., Maul-Pavicic, A., Beutel, K., Janka, G., Griffiths, G., Ehl, S., Hennies, H.C., 2009. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 482–492. doi:10.1016/j.ajhg.2009.09.005
- Stanley, K.K., Howell, K.E., 1993. TGN38/41: a molecule on the move. *Trends Cell Biol.* 3, 252–255.
- Starr, T., Sun, Y., Wilkins, N., Storrer, B., 2010. Rab33b and Rab6 are functionally overlapping regulators of Golgi homeostasis and trafficking. *Traffic* 11, 626–636. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01051.x
- Steenblock, C., Heckel, T., Czupalla, C., Santo, A.I.E., Niehage, C., Sztacho, M., Hoflack, B., 2014. The Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor FGD6 Coordinates Cell Polarity and Endosomal Membrane Recycling in Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* 289, 18347–18359. doi:10.1074/jbc.M113.504894
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525. doi:10.1038/nrm2728
- Stinchcombe, J.C., Barral, D.C., Mules, E.H., Booth, S., Hume, A.N., Machesky, L.M., Seabra, M.C., Griffiths, G.M., 2001a. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152, 825–833.

- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G.M., 2001b. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751–761.
- Stinchcombe, J.C., Griffiths, G.M., 2014. Communication, the centrosome and the immunological synapse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 369, 20130463. doi:10.1098/rstb.2013.0463
- Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., Griffiths, G.M., 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462–465. doi:10.1038/nature05071
- Stinchcombe, J.C., Randzavola, L.O., Angus, K.L., Mantell, J.M., Verkade, P., Griffiths, G.M., 2015. Mother Centriole Distal Appendages Mediate Centrosome Docking at the Immunological Synapse and Reveal Mechanistic Parallels with Ciliogenesis. *Curr. Biol.* 25, 3239–3244. doi:10.1016/j.cub.2015.10.028
- Straus, D.B., Weiss, A., 1992. Genetic evidence for the involvement of the Lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585–593.
- Strom, M., Hume, A.N., Tarafder, A.K., Barkagianni, E., Seabra, M.C., 2002. A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25423–25430. doi:10.1074/jbc.M202574200
- Su, X., Ditlev, J.A., Hui, E., Xing, W., Banjade, S., Okrut, J., King, D.S., Taunton, J., Rosen, M.K., Vale, R.D., 2016. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Science* 352, 595–599. doi:10.1126/science.aad9964
- Summers deLuca, L., Gommerman, J.L., 2012. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 339–351. doi:10.1038/nri3193
- Szalinski, C.M., Labilloy, A., Bruns, J.R., Weisz, O.A., 2014. VAMP7 modulates ciliary biogenesis in kidney cells. *PLoS ONE* 9, e86425. doi:10.1371/journal.pone.0086425
- Tai, G., Lu, L., Johannes, L., Hong, W., 2005. Functional analysis of Arl1 and golgin-97 in endosome-to-TGN transport using recombinant Shiga toxin B fragment. *Meth. Enzymol.* 404, 442–453. doi:10.1016/S0076-6879(05)04039-5
- Tamura, K., Ohbayashi, N., Ishibashi, K., Fukuda, M., 2011. Structure-function analysis of VPS9-ankyrin-repeat protein (Varp) in the trafficking of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 7507–7521. doi:10.1074/jbc.M110.191205
- Tamura, K., Ohbayashi, N., Maruta, Y., Kanno, E., Itoh, T., Fukuda, M., 2009. Varp Is a Novel Rab32/38-binding Protein That Regulates Tyrp1 Trafficking in Melanocytes. *Mol. Biol. Cell* 20, 2900–2908. doi:10.1091/mbc.E08-12-1161
- Tanimura, N., Saitoh, S.-I., Kawano, S., Kosugi, A., Miyake, K., 2006. Palmitoylation of LAT contributes to its subcellular localization and stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 1177–1183. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.076
- Thome, M., Tschopp, J., 2003. TCR-induced NF- κ B activation: a crucial role for Carma1, Bcl10 and MALT1. *Trends Immunol.* 24, 419–424. doi:10.1016/S1471-4906(03)00177-7
- Thompson, J.L., Mignen, O., Shuttleworth, T.J., 2009. The Orai1 severe combined immune deficiency mutation and calcium release-activated Ca²⁺ channel function in the heterozygous condition. *Journal of Biological Chemistry* 284, 6620–6626. doi:10.1074/jbc.M808346200
- Touret, M., Guégan, S., Chemin, K., Dogniaux, S., Miro, F., Bohineust, A., Hivroz, C., 2010. T cell polarity at the immunological synapse is required for CD154-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *J. Immunol.* 185, 6809–6818. doi:10.4049/jimmunol.1001501
- Tsun, A., Qureshi, I., Stinchcombe, J.C., Jenkins, M.R., la Roche, de, M., Kleczkowska, J., Zamoyska, R., Griffiths, G.M., 2011. Centrosome docking at the immunological synapse is controlled by Lck signaling. *J. Cell Biol.* 192, 663–674. doi:10.1083/jcb.201008140
- Ueda, H., Morphew, M.K., McIntosh, J.R., Davis, M.M., 2011. CD4⁺ T-cell synapses involve multiple distinct stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 17099–17104. doi:10.1073/pnas.1113703108
- Uhlig, M., Passlack, W., Eckel, J., 2005. Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 235, 1–9. doi:10.1016/j.mce.2005.02.004
- Utskarpen, A., Slagsvold, H.H., Dyve, A.B., Skånland, S.S., Sandvig, K., 2007. SNX1 and SNX2 mediate retrograde transport of Shiga toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 566–570. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.159
- Utskarpen, A., Slagsvold, H.H., Iversen, T.-G., Wälchli, S., Sandvig, K., 2006. Transport of ricin from endosomes to the Golgi apparatus is regulated by Rab6A and Rab6A'. *Traffic* 7, 663–672. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00418.x
- Valente, C., Polishchuk, R., De Matteis, M.A., 2010. Rab6 and myosin II at the cutting edge of membrane fission. *Nat. Cell Biol.* 12, 635–638. doi:10.1038/ncb0710-635
- van Oers, N.S., Killeen, N., Weiss, A., 1996. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* 183, 1053–1062.

- van Panhuys, N., Klauschen, F., Germain, R.N., 2014. T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization *In Vivo*. *Immunity* 41, 63–74. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.003
- Vardhana, S., Choudhuri, K., Varma, R., Dustin, M.L., 2010. Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 32, 531–540. doi:10.1016/j.immuni.2010.04.005
- Varga, G., Nippe, N., Balkow, S., Peters, T., Wild, M.K., Seeliger, S., Beissert, S., Krummen, M., Roth, J., Sunderkötter, C., Grabbe, S., 2010. LFA-1 contributes to signal I of T-cell activation and to the production of T(h)1 cytokines. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1005–1012. doi:10.1038/jid.2009.398
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., Dustin, M.L., 2006. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 25, 117–127. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.010
- Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., Samelson, L.E., Bolen, J.B., 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* 338, 257–259. doi:10.1038/338257a0
- Vieira, S.I., Rebelo, S., Esselmann, H., Wiltfang, J., Lah, J., Lane, R., Small, S.A., Gandy, S., da Cruz e Silva, E.F., da Cruz e Silva, O.A., 2010. Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated. *Mol Neurodegener* 5, 40. doi:10.1186/1750-1326-5-40
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532. doi:10.1038/nri2343
- Vivar, O.I., Masi, G., Carpiere, J.-M., Magalhaes, J.G., Galgano, D., Pazour, G.J., Amigorena, S., Hivroz, C., Baldari, C.T., 2015. IFT20 controls LAT recruitment to the immune synapse and T-cell activation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 201513601. doi:10.1073/pnas.1513601113
- Vivona, S., Liu, C.W., Strop, P., Rossi, V., Filippini, F., Brunger, A.T., 2010. The longin SNARE VAMP7/TI-VAMP adopts a closed conformation. *J. Biol. Chem.* 285, 17965–17973. doi:10.1074/jbc.M110.120972
- Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouillé, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J.-F., Hoflack, B., 2003. Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 142–155. doi:10.1091/mbc.E02-06-0338
- Wakana, Y., van Galen, J., Meissner, F., Scarpa, M., Polishchuk, R.S., Mann, M., Malhotra, V., 2012. A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *EMBO J.* 31, 3976–3990. doi:10.1038/emboj.2012.235
- Wang, F., Zhang, H., Zhang, X., Wang, Y., Ren, F., Zhang, X., Zhai, Y., Chang, Z., 2008. Varp interacts with Rab38 and functions as its potential effector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 162–167. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.017
- Wang, H., Kadlecsek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E.S., Hsu, L.-Y., Freedman, T.S., Weiss, A., 2010. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *J. Biol. Chem.* 285, a002279–a002279. doi:10.1101/cshperspect.a002279
- Wang, Y., Kissenpfennig, A., Mingueneau, M., Richelme, S., Perrin, P., Chevrier, S., Genton, C., Lucas, B., DiSanto, J.P., Acha-Orbea, H., Malissen, B., Malissen, M., 2008. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 180, 1565–1575. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1565
- Wanschers, B., van de Vorstenbosch, R., Wijers, M., Wieringa, B., King, S.M., Fransen, J., 2008. Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil. Cytoskeleton* 65, 183–196. doi:10.1002/cm.20254
- Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M.V., Oakley, J., Traer, C.J., Cullen, P.J., 2007. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J. Cell. Sci.* 120, 45–54. doi:10.1242/jcs.03302
- Wassmer, T., Attar, N., Harterink, M., van Weering, J.R.T., Traer, C.J., Oakley, J., Goud, B., Stephens, D.J., Verkade, P., Korswagen, H.C., Cullen, P.J., 2009. The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev Cell* 17, 110–122. doi:10.1016/j.devcel.2009.04.016
- Watkins, J.L., Lewandowski, K.T., Meek, S.E.M., Storz, P., Toker, A., Piwnicka-Worms, H., 2008. Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18378–18383. doi:10.1073/pnas.0809661105
- Weil, R., Schwamborn, K., Alcover, A., Bessia, C., Di Bartolo, V., Israel, A., 2003. Induction of the NF-kappa B cascade by recruitment of the scaffold molecule NEMO to the T cell receptor. *Immunity*

18, 13–26.

- Weiss, A., 2005. Discovering the TCR α -Chain by Subtraction. *The Journal of Immunology* 175, 2769–2770. doi:10.4049/jimmunol.175.5.2769
- Welz, T., Wellbourne-Wood, J., Kerkhoff, E., 2014. Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol.* 24, 407–415. doi:10.1016/j.tcb.2014.02.004
- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B., Stelzer, E., 1999. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 147, 743–759.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., SALAMERO, J., 2000. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell Biol.* 151, 1207–1220.
- Williams, D., Pessin, J.E., 2008. Mapping of R-SNARE function at distinct intracellular GLUT4 trafficking steps in adipocytes. *J. Cell Biol.* 180, 375–387. doi:10.1083/jcb.200709108
- Williamson, D.J., Owen, D.M., Rossy, J., Magenau, A., Wehrmann, M., Gooding, J.J., Gaus, K., 2011. Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events. *Nat. Immunol.* 12, 655–662. doi:10.1038/ni.2049
- Wilson, B.S., Pfeiffer, J.R., Surviladze, Z., Gaudet, E.A., Oliver, J.M., 2001. High resolution mapping of mast cell membranes reveals primary and secondary domains of Fc(ϵ)RI and LAT. *J. Cell Biol.* 154, 645–658. doi:10.1083/jcb.200104049
- Wilson, S.M., Yip, R., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Zhang, Y., Novak, E.K., Swank, R.T., Russell, L.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 2000. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7933–7938. doi:10.1073/pnas.140212797
- Wooldridge, L., van den Berg, H.A., Glick, M., Gostick, E., Laugel, B., Hutchinson, S.L., Milicic, A., Brenchley, J.M., Douek, D.C., Price, D.A., Sewell, A.K., 2005. Interaction between the CD8 coreceptor and major histocompatibility complex class I stabilizes T cell receptor-antigen complexes at the cell surface. *Journal of Biological Chemistry* 280, 27491–27501. doi:10.1074/jbc.M500555200
- Wulfiging, C., Davis, M.M., 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282, 2266–2269.
- Yamasaki, S., Nishida, K., Sakuma, M., Berry, D., McGlade, C.J., Hirano, T., Saito, T., 2003. Gads/Grb2-mediated association with LAT is critical for the inhibitory function of Gab2 in T cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2515–2529.
- Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S.P., Aleksander, I., Mak, T.W., 1984. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308, 145–149.
- Yang, C.-W., Hojer, C.D., Zhou, M., Wu, X., Wuster, A., Lee, W.P., Yaspan, B.L., Chan, A.C., 2016. Regulation of T Cell Receptor Signaling by DENND1B in TH2 Cells and Allergic Disease. *Cell* 164, 141–155. doi:10.1016/j.cell.2015.11.052
- Yang, X., Zhang, Y., Li, S., Liu, C., Jin, Z., Wang, Y., Ren, F., Chang, Z., 2012. Rab21 attenuates EGF-mediated MAPK signaling through enhancing EGFR internalization and degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 651–657. doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.049
- Yasuda, T., Bundo, K., Hino, A., Honda, K., Inoue, A., Shirakata, M., Osawa, M., Tamura, T., Nariuchi, H., Oda, H., Yamamoto, T., Yamanashi, Y., 2007. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int. Immunol.* 19, 487–495. doi:10.1093/intimm/dxm015
- Yi, J., Wu, X., Chung, A.H., Chen, J.K., Kapoor, T.M., Hammer, J.A., 2013. Centrosome repositioning in T cells is biphasic and driven by microtubule end-on capture-shrinkage. *J. Cell Biol.* 202, 779–792. doi:10.1083/jcb.201301004
- Yokosuka, T., Kobayashi, W., Sakata-Sogawa, K., Takamatsu, M., Hashimoto-Tane, A., Dustin, M.L., Tokunaga, M., Saito, T., 2008. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C θ translocation. *Immunity* 29, 589–601. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.011
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., Saito, T., 2005. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol.* 6, 1253–1262. doi:10.1038/ni1272
- Yudushkin, I.A., Vale, R.D., 2010. Imaging T-cell receptor activation reveals accumulation of tyrosine-phosphorylated CD3 ζ in the endosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22128–22133. doi:10.1073/pnas.1016388108
- Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P., Tavitian, A., 1989. The human Rab genes encode a family of

- GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *Journal of Biological Chemistry* 264, 12394–12401.
- Zhang, D., Dubey, J., Koushika, S.P., Rongo, C., 2016. RAB-6.1 and RAB-6.2 Promote Retrograde Transport in *C. elegans*. *PLoS ONE* 11, e0149314. doi:10.1371/journal.pone.0149314
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., Samelson, L.E., 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83–92.
- Zhang, W., Sommers, C.L., Burshtyn, D.N., Stebbins, C.C., DeJarnette, J.B., Tribble, R.P., Grinberg, A., Tsay, H.C., Jacobs, H.M., Kessler, C.M., Long, E.O., Love, P.E., Samelson, L.E., 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10, 323–332.
- Zhang, W., Tribble, R.P., Zhu, M., Liu, S.K., McGlade, C.J., Samelson, L.E., 2000. Association of Grb2, Gads, and Phospholipase C- 1 with Phosphorylated LAT Tyrosine Residues: EFFECT OF LAT TYROSINE MUTATIONS ON T CELL ANTIGEN RECEPTOR-MEDIATED SIGNALING. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23355–23361. doi:10.1074/jbc.M000404200
- Zhang, W.G., Tribble, R.P., Samelson, L.E., 1998. LAT palmitoylation: Its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239–246.
- Zhang, X., He, X., Fu, X.-Y., Chang, Z., 2006. Varp is a Rab21 guanine nucleotide exchange factor and regulates endosome dynamics. *J. Cell. Sci.* 119, 1053–1062. doi:10.1242/jcs.02810
- Zhou, B., Wu, Y., Lin, X., 2011. Retromer regulates apical-basal polarity through recycling Crumbs. *Dev. Biol.* 360, 87–95. doi:10.1016/j.ydbio.2011.09.009
- Zhu, M., Janssen, E., Zhang, W., 2003. Minimal Requirement of Tyrosine Residues of Linker for Activation of T Cells in TCR Signaling and Thymocyte Development. *The Journal of Immunology* 170, 325–333. doi:10.4049/jimmunol.170.1.325
- Zou, Q., Jin, J., Xiao, Y., Hu, H., Zhou, X., Jie, Z., Xie, X., Li, J.Y.H., Cheng, X., Sun, S.-C., 2015. T cell development involves TRAF3IP3-mediated ERK signaling in the Golgi. *J. Exp. Med.* 212, 1323–1336. doi:10.1084/jem.20150110

ANNEXES

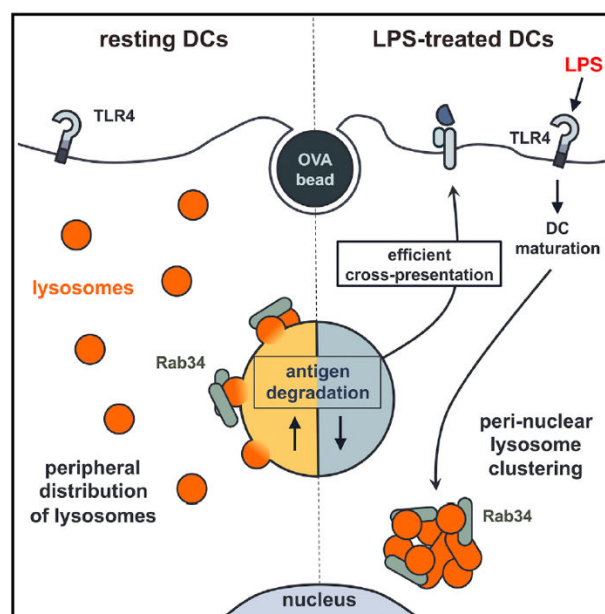
ANNEXE 1 : Autres contributions scientifiques

Toll-like Receptor-4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens

Andrés Alloatti, Fiorella Kotsias, Anne-Marie Pauwels, Jean-Marie Carpier, Mabel Jouve, Evy Timmerman, Luigia Pace, Pablo Vargas, Mathieu Maurin, Ulf Gehrmann, Leonel Joannas, Omar I. Vivar, Ana-Maria Lennon-Duménil, Ariel Savina, Kris Gevaert, Rudi Beyaert, Eik Hoffmann*, and Sebastian Amigorena*

Ce travail en collaboration avec l'équipe de Sebastian Amigorena montre que la maturation des DCs dépendante du LPS (ligand du TLR-4) contribue à l'augmentation de l'efficacité de cross-présentation qui joue un rôle important dans la présentation aux lymphocytes T CD8⁺ d'antigènes exogènes internalisés dans des phagosomes. Cet effet du LPS est associé à un retard de la dégradation du contenu phagosomale qui serait lié à une diminution de leur fusion avec les lysosomes. Il est proposé dans cet article que ce retard de dégradation, nécessaire à l'export des antigènes depuis les phagosomes pour un aprêtement par le CMH-I, est lié au regroupement des lysosomes d'une manière dépendante de Rab34.

La contribution que j'ai apportée à ce travail a principalement consisté au design des expériences d'immunofluorescence et au développement d'un script d'analyse d'image semi-automatique permettant la mesure du « clustering » des lysosomes dans des cellules déficientes pour Rab34 (voir Annexe 2). J'ai également participé à quelques expériences *in vivo* chez la souris.



(Alloatti et al., 2015)

ANNEXE 2 : Scripts utilisés pour les analyses d'images

Analyse du recrutement de LAT à la synapse immune formée entre des cellules T Jurkat et des cellules Raji et création de « cellules moyennes »

```
1 /*Script#1 : Synapse Extraction*/
2
3
4 dirdata = getDirectory("Choisir le dossier contenant les stacks à analyser"); // choix des dossier contenant les images a analyser
5 dir = getDirectory("Choisir le dossier pour la sauvegarde des couples de cellules choisies");
6 dir1 = getDirectory("Choisir le dossier pour la sauvegarde des cellules d'interret");
7
8
9
10 imagenames=getFileList(dirdata); // tableau contenant le nom des fichier contenus dans le dossier dirdata
11 nbimages=lengthOf(imagenames); // longueur du tableau == nombre de fichier dans le dossier
12
13
14 for(image=0; image<nbimages; image++) { // boucle sur les images contenues dans dirdata
15
16     name=imagenames[image]; // ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
17     totnameLength=lengthOf(name); // enleve l'extension a name
18     nameLength=totnameLength-4; // exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
19     name1=substring(name, 0, nameLength); // name1=name sans le .tif
20     extension=substring(name, nameLength, totnameLength);
21
22     if(extension==".tif") {
23         open(dirdata+name);
24         selectWindow(name);
25         Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
26         setTool("line");
27         waitForUser("choisi le plan de la synapse et trace la ligne");
28         run("Measure");
29         anglesynapse=getResult("Angle", 0)-90;
30         Stack.getPosition(channel1, slice1, frame1);
31         run("Clear Results");
32         run("Duplicate...", "title=temp.tif duplicate channels=1-"+channels+" slices="+slice1+"");
33         run("Rotate...", "angle="+anglesynapse+" grid=1 interpolation=Bilinear enlarge");
34         selectWindow("temp.tif");
35         setTool("rectangle");
36         waitForUser("choisi la cellule d'interret");
37         run("Duplicate...", "title=temp1.tif duplicate channels=1-"+channels+"");
38
39         // ask for flip or not
40         yesno=newArray("yes", "no");
41         Dialog.create("Turn the cell");
42         Dialog.addCheckbox("Turn the cell", false);
43         Dialog.show();
44         turn= Dialog.getCheckbox();
45
46         if(turn==true) {
47             selectWindow("temp1.tif");
48             run("Flip Horizontally");
49         }
50
51         selectWindow("temp.tif");
52         saveAs("Tiff", dir + name1+"_synapse_plane");
53         run("Close");
54         selectWindow("temp1.tif");
55         saveAs("Tiff", dir1 + name1+"_crop.tif");
56         run("Close");
57         selectWindow(name);
58         run("Close");
59     }
60 }
61 waitForUser("Done ! ;D");
```

```

1 /*Script#2 : Normalization within each condition */
2 // Fiji settings
3
4 run("Set Measurements...", "area mean standard min centroid center integrated display redirect=None decimal=3");
5 run("Options...", "iterations=1 count=1 black edm=Overwrite");
6 run("Colors...", "foreground=white background=black selection=yellow");
7
8 // Folders settings
9
10 dirdata = getDirectory("Choisir le dossier contenant les images pour le mapping");
11 dir = getDirectory("Choisir le dossier pour la sauvegarde des resultas");
12
13 /// Dialog Box
14
15 Dialog.create("Parametres de l'analyse");
16 Dialog.addNumber("Useless channel", 1, 0, 8, "index du canal");
17 Dialog.addNumber("Useless channel", 3, 0, 8, "index du canal");
18 //Dialog.addNumber("Useless channel", 4, 0, 8, "index du canal");
19
20 Dialog.show();
21 channeltoclose1 = Dialog.getNumber();
22 //channeltoclose2 = Dialog.getNumber();
23 //channeltoclose3 = Dialog.getNumber();
24
25 imagenames=getFileList(dirdata); /// tableau contenant le nom des fichier contenus dans le dossier dirdata
26 nbimages=lengthOf(imagenames); /// longueur du tableau == nombre de fichier dans le dossier
27
28 setBatchMode(true);
29
30 for(image=0; image<nbimages; image++) { /// boucle sur les images contenues dans dirdata
31
32     name=imagenames[image]; /// ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
33     totnameLength=lengthOf(name); /// enleve l'extension a name
34     nameLength=totnameLength-4; /// exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
35     name1=substring(name, 0, nameLength); /// name1=name sans le .tif
36     extension=substring(name, nameLength, totnameLength);
37     if(extension=="tif") {
38         open(dirdata+name);
39         selectWindow(name);
40         run("Split Channels");
41         selectWindow("C"+channeltoclose1+"-"+name);
42         run("Close");
43         //selectWindow("C"+channeltoclose2+"-"+name);
44         //run("Close");
45         //selectWindow("C"+channeltoclose3+"-"+name);
46         //run("Close");
47     }
48 }
49
50
51 run("Images to Stack", "method=[Scale (smallest)] name=Stack title=[] use");
52 selectWindow("Stack");
53 nbcells=nSlices;
54 meanInt=newArray(nbcells);
55 for(i=0;i<nbcells;i++) {
56     selectWindow("Stack");
57     setSlice(i+1);
58     run("Select All");
59     run("Measure");
60     meanInt[i]=getResult("Mean", 0);
61     run("Clear Results");
62 }
63
64 Array.getStatistics(meanInt, minmeanInt, maxmeanInt, meanmeanInt, stdDevmeanInt);
65
66 for(i=0;i<nbcells;i++) {
67     selectWindow("Stack");
68     setSlice(i+1);
69     normfactor=meanmeanInt/meanInt[i];
70     run("Multiply...", "value="+normfactor+" slice");
71 }
72 saveAs("Tiff", dir + name1+" Hyperstack.tif");
73 run("Close");
74 selectWindow("Results");
75 run("Close");
76 setBatchMode(false);

```



```

1 /*Script#3 : Normalization between conditions & Mean cell creation */
2
3 // Folders settings
4 dirdata = getDirectory("Choisir le dossier contenant les images pour le mapping");
5 dir = getDirectory("Choisir le dossier pour la sauvegarde des resultas");
6
7
8 imagenames=getFileList(dirdata); /// tableau contenant le nom des fichier contenus dans le dossier dirdata
9 nbimages=lengthOf(imagenames); /// longueur du tableau == nombre de fichier dans le dossier
10
11 setBatchMode(true);
12
13 widthtot=0;
14 heighttot=0;
15 meaninttot=0;
16
17 compteur=0;
18
19 for(image=0; image<nbimages; image++) {
20     name=imagenames[image]; /// ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
21     totnameLength=lengthOf(name); /// enleve l'extension a name
22     namelength=totnameLength-4; /// exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
23     name1=substring(name, 0, namelength); /// name1==name sans le .tif
24     extension=substring(name, namelength, totnameLength);
25     if(extension==".tif") {
26         compteur=compteur+1;
27         open(dirdata+name);
28         selectWindow(name);
29         Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
30         run("Properties...", "channels=1 slices="+slices+" frames=1 unit=[] pixel_width=1 pixel_height=1 voxel_depth=1");
31         widthtot=widthtot+width;
32         heighttot=heighttot+height;
33         run("Select All");
34         run("Measure");
35         mean=getResult("Mean",0);
36         run("Clear Results");
37         meaninttot=meaninttot+mean;
38     }
39 }
40
41 meanintmean=meaninttot/compteur;
42 widthmean=widthtot/compteur;
43 heightmean=heighttot/compteur;
44
45 for(image=0; image<nbimages; image++) {
46     name=imagenames[image]; /// ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
47     totnameLength=lengthOf(name); /// enleve l'extension a name
48     namelength=totnameLength-4; /// exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
49     name1=substring(name, 0, namelength); /// name1==name sans le .tif
50     extension=substring(name, namelength, totnameLength);
51     if(extension==".tif") {
52         selectWindow(name);
53         Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
54         run("Select All");
55         run("Measure");
56         mean=getResult("Mean",0);
57         run("Clear Results");
58         selectWindow(name);
59         run("Size...", "width="+widthmean+" height="+heightmean+" depth="+slices+" average interpolation=Bilinear");
60         normfactor=meanintmean/mean;
61         run("Multiply...", "value="+normfactor+" stack");
62         selectWindow("Results");
63         run("Close");
64     }
65 }
66
67 for(image=0; image<nbimages; image++) {
68     name=imagenames[image]; /// ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
69     totnameLength=lengthOf(name); /// enleve l'extension a name
70     namelength=totnameLength-4; /// exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
71     name1=substring(name, 0, namelength); /// name1==name sans le .tif
72     extension=substring(name, namelength, totnameLength);
73     if(extension==".tif") {
74         selectWindow(name);
75         run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]");
76         saveAs("Tiff", dir + name1+" FinalMeanCell.tif");
77         selectWindow(name);
78         run("Close");
79     }
80 }
81
82     run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");
83     saveAs("Tiff", dir + name1+" STACKMEANCELL.tif");
84     run("Close");
85 setBatchMode(true);

```

```

1 /*Script#4 : Normalization between conditions & Mean profile creation */
2
3 // Folders settings
4 dirdata = getDirectory("Choisir le dossier contenant les images pour le mapping");
5 dir = getDirectory("Choisir le dossier pour la sauvegarde des resultas");
6
7
8 imagenames=getFileList(dirdata); /// tableau contenant le nom des fichier contenus dans le dossier dirdata
9 nbimages=lengthOf(imagenames); /// longueur du tableau == nombre de fichier dans le dossier
10
11 setBatchMode(true);
12
13 widthtot=0;
14 heighttot=0;
15 meaninttot=0;
16
17 compteur=0;
18
19 for(image=0; image<nbimages; image++) {
20     name=imagenames[image]; /// ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
21     totname=lengthOf(name); /// enleve l'extension a name
22     namelength=totname-4; /// exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
23     name1=substring(name, 0, namelength); /// name1==name sans le .tif
24     extension=substring(name, namelength, totname);
25     if(extension==".tif") {
26         compteur=compteur+1;
27         open(dirdata+name);
28         selectWindow(name);
29         Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
30         run("Properties...", "channels=1 slices="+slices+" frames=1 unit=[] pixel_width=1 pixel_height=1 voxel_depth=1");
31         widthtot=widthtot+width;
32         heighttot=heighttot+height;
33         run("Select All");
34         run("Measure");
35         mean=getResult("Mean",0);
36         run("Clear Results");
37         meaninttot=meaninttot+mean;
38     }
39 }
40
41 meanintmean=meaninttot/compteur;
42 widthmean=widthtot/compteur;
43 heightmean=heighttot/compteur;
44
45 for(image=0; image<nbimages; image++) {
46     name=imagenames[image]; /// ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
47     totname=lengthOf(name); /// enleve l'extension a name
48     namelength=totname-4; /// exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
49     name1=substring(name, 0, namelength); /// name1==name sans le .tif
50     extension=substring(name, namelength, totname);
51     if(extension==".tif") {
52         selectWindow(name);
53         Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
54         run("Select All");
55         run("Measure");
56         mean=getResult("Mean",0);
57         run("Clear Results");
58         selectWindow(name);
59         run("Size...", "width="+widthmean+" height=1 depth="+slices+" average interpolation=Bilinear");
60         normfactor=meanintmean/mean;
61         run("Multiply...", "value="+normfactor+" stack");
62         selectWindow("Results");
63         run("Close");
64     }
65 }
66
67 for(image=0; image<nbimages; image++) {
68     name=imagenames[image]; /// ici prends le nom des images dans le dossier dirdata dans l'ordre de la boucle
69     totname=lengthOf(name); /// enleve l'extension a name
70     namelength=totname-4; /// exemple ici, on enleve les 4 derniers caracteres
71     name1=substring(name, 0, namelength); /// name1==name sans le .tif
72     extension=substring(name, namelength, totname);
73     if(extension==".tif") {
74         selectWindow(name);
75         run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]");
76         selectWindow(name);
77         run("Z Project...", "projection=[Standard Deviation]");
78         for(i=0; i<widthmean; i++) {
79             selectWindow("AVG_"+name);
80             setResult("AVG", i, getPixel(i,0));
81             selectWindow("STD_"+name);
82             setResult("STD", i, getPixel(i,0));
83         }
84         updateResults();
85         selectWindow("Results");
86         saveAs("Results",dir+name1+"_Results.txt");
87         run("Close");
88     }
89 }
90 }

```



```

1 /* Script#5 : Cell by cell quantification from script#2 */
2
3 /// Fiji settings
4 run("Set Measurements...", "area mean standard min centroid center integrated display redirect=None decimal=3");
5 run("Options...", "iterations=1 count=1 black edm=Overwrite");
6 run("Colors...", "foreground=white background=black selection=yellow");
7 roiManager("Show None");
8 if(isOpen("Results")==1) {
9     selectWindow("Results");
10    run("Close");
11 }
12 if(isOpen("My Results")==1) {
13     selectWindow("My Results");
14     run("Close");
15 }
16 if(isOpen("Log")==1) {
17     selectWindow("Log");
18     run("Close");
19 }
20 run("Close All");
21
22 // Directories
23 dirdata = getDirectory("Choose the folder containing the data to analyse...");
24 dir = getDirectory("Choose the folder where results will be saved...");
25
26 /// Dialog Box
27
28
29
30
31 setBatchMode(false);
32
33 /// Variables
34 imagenames=getFileList(dirdata);
35 nbimages=lengthOf(imagenames);
36 SynapseSize=0.105;
37
38
39 //Result table settings
40 setResult("Slice Position", 0, "Slice Position");
41 setResult("Slice Position", 0, "Slice Position");
42 setResult("MEAN INTENSITY TOT", 0, "MEAN INTENSITY TOT");
43 setResult("MEAN INTENSITY SYN", 0, "MEAN INTENSITY SYN");
44 updateResults();
45
46 IJ.renameResults("Results", "My Results");
47
48 //Loop for the images in "dirdata"
49
50 for(image=0; image<nbimages; image++) {
51     name=imagenames[image];
52     totnameLength=lengthOf(name);
53     nameLength=totnameLength-4;
54     name1=substring(name, 0, nameLength);
55
56     number=number+1;
57     roiManager("reset");
58     open(dirdata+name);
59     selectWindow(name);
60     //run("8-bit");
61     run("Select None");
62     print(name1);
63
64     selectWindow(name);
65     run("Select None");
66     Stack.getDimensions(width, height, chan, slices, frames);
67
68     MeanIntensityTotalCell=newArray(slices);
69     SliceLabel=newArray(slices);
70     MeanIntensitySynapse=newArray(slices);
71     slicePosition=newArray(slices);
72
73     WidthSynapse=width*SynapseSize;
74
75     for(s=0; s<slices; s++) {
76         selectWindow(name);
77         Stack.setSlice(s+1);
78
79         Stack.getPosition(chan, slice, frame);
80         slicePosition[s]=slice;
81
82         SliceLabel[s]=getInfo("slice.label");
83
84
85         run("Select None");
86         run("Measure");
87         MeanIntensityTotalCell[s]=getResult("Mean", 0);
88         run("Clear Results");
89
90         makeRectangle(width-WidthSynapse, 0, WidthSynapse, height);
91         run("Measure");
92         MeanIntensitySynapse[s]=getResult("Mean", 0);
93         run("Clear Results");

```

```
94
95
96
97 IJ.renameResults("My Results", "Results");
98 setResult("Slice Position", slicePosition[s], SliceLabel[s]);
99 setResult("MEAN INTENSITY TOT", slicePosition[s], MeanIntensityTotalCell[s]);
100 setResult("MEAN INTENSITY SYN", slicePosition[s], MeanIntensitySynapse[s]);
101 IJ.renameResults("Results", "My Results");
102 updateResults();
103 selectWindow("My Results");
104 saveAs("Results", dir+name1+"_My Results.xls");
105 IJ.renameResults(name1+"_My Results.xls", "My Results");
106
107 }
108 IJ.renameResults("My Results", "Results");
109 selectWindow("Results");
110 run("Close");
111 selectWindow(name);
112 run("Close");
113
114 setResult("Slice Position", 0, "Slice Position");
115 setResult("Slice Position", 0, "Slice Position");
116 setResult("MEAN INTENSITY TOT", 0, "MEAN INTENSITY TOT");
117 setResult("MEAN INTENSITY SYN", 0, "MEAN INTENSITY SYN");
118 updateResults();
119 IJ.renameResults("Results", "My Results");
120 }
```

Analyse de LAT, phospho-LAT et ZAP70 à la synapse immunologique par microscopie

TIRF

```
1 /* Script#6 : Microclusters counting from TIRF images
2 *
3 Macro ImageJ (v. 1.45g) SEMI-AUTOMATED ANALYSIS OF MICROCLUSTERS IN INDIVIDUAL CELLS
4 authors: Perrine Gilloteaux Perrine.Paul@curie.fr & Jean-Marie CARPIER jean-marie.carpier@curie.fr*/
5 requires("1.45g");
6
7 // Setup of Fiji parameters
8 run("Set Measurements...", "area mean standard min centroid center integrated display redirect=None decimal=3");
9 run("Options...", "iterations=1 count=1 black edm=Overwrite");
10 run("Colors...", "foreground=white background=black selection=yellow");
11 run("Clear Results");
12 roiManager("reset");
13
14 repertoire=getDirectory("Choose the directory where the images are stored...");
15 dirresults=getDirectory("Choose the directory where you want to save the results...");
16
17 listedefichier=getFileList(repertoire);
18 nombredefichier=listedefichier.length;
19
20 /// Dialog Box
21
22 Dialog.create("Analysis parameters");
23 Dialog.addNumber("Laser Wavelength", 561, 0, 8, "(channel index)");
24 Dialog.addNumber("Noise tolerance", 5000, 0, 8, "(value)");
25 Dialog.addNumber("Acquisition time point", 3, 0, 8, "(value)");
26 Dialog.show();
27 laser = Dialog.getNumber();
28 noise = Dialog.getNumber();
29 timepoint=Dialog.getNumber();
30
31
32
33 run("Set Measurements...", "area display redirect=None decimal=3");
34 for(i=0;i<nombredefichier;i++){
35 run("Close All");
36 if((indexOf(listedefichier[i], laser+"_t"+timepoint+".TIF")>0)){
37 // Loop for all images .tif in the folder,
38 fichiercourant=repertoire+listedefichier[i];
39 filename=replace(listedefichier[i], ".tif", "");
40 roiManager("reset");
41 open(fichiercourant);
42 imagetitleori=getTitle();
43 run("Duplicate...", "in8bits");
44 run("8-bit");
45 rename("8bits");
46 selectWindow(imagetitleori);
47 // do background correction
48 run("Subtract Background...", "rolling=50 light sliding");
49 imagetitle=getTitle();
50
51 run("Add to Manager"); //nothing added, just to create it.
52 roiManager("Show All");
53
54 setTool("freehand");
55 beep(); //alert the user
56 waitForUser("Now you can edit the cells mask by removing or adding cells (use the selection tool and the add/remove ROI buttons.
57
58
59 roiManager("Save", dirresults+"Cellset_"+filename+".zip");
60
61
62
63
64 // Loop for the ROI contained in the ROI manager and count microclusters for each ROI
65 nombrederois=roiManager("count");
66 for (indexroi=0; indexroi<nombrederois; indexroi++){
67 roiManager("Select", indexroi);
68 run("Measure"); // go to result (for cell area)
69
70 }
71 for (indexroi=0; indexroi<nombrederois; indexroi++){
72 roiManager("Select", indexroi);
73
74 run("Find Maxima...", "noise="+noise+" output=[Single Points]");
75 singlepointtitle=getTitle();
76 // analyse particle to measure the number of spots
77 run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
78
79 //selectWindow(imagetitle);
80
81 run("Merge Channels...", "red=[8bits] green=["+singlepointtitle+"] blue=None* gray=None* create keep");
82 saveAs("Jpeg", dirresults+ filename+"_cell_"+indexroi);
83 selectWindow(imagetitle);
84
85 }
86
87 }
```

```
88
89 //save the results (summary)
90 selectWindow("Summary");
91 saveAs("Text", dirresults+"Summarynbspotscells.xls");
92 selectWindow("Results");
93 saveAs("Results", dirresults+"ResultsAreacells.xls");
```

Analyse des aires des marquages de LAT et de l'appareil de Golgi sur des images confocales.

```

1 /* Script#7 : Calculation of overlapping area between two channels "A" and "B" in T lymphocytes conjugated with APC |
2 Version : 8.1
3 Macro written by Jean-Marie CARPIER (jean-marie.carpier@gmail.com)*/
4
5 // Setup of Fiji parameters
6 run("Set Measurements...", "area mean standard min centroid center integrated display redirect=None decimal=3");
7 run("Options...", "iterations=1 count=1 black edm=Overwrite");
8 run("Colors...", "foreground=white background=black selection=yellow");
9 run("Clear Results");
10 if(isOpen("Results")==1) {
11     selectWindow("Results");
12     run("Close");
13 }
14 if(isOpen("My Results")==1) {
15     selectWindow("My Results");
16     run("Close");
17 }
18 if(isOpen("Log")==1) {
19     selectWindow("Log");
20     run("Close");
21 }
22 run("Close All");
23
24 // Directories
25 dirdata = getDirectory("Choose the folder containing the data to analyse..");
26 dir = getDirectory("Choose the folder where results will be saved..");
27
28 /// Dialog Box
29 Dialog.create("Name of the markers to study..");
30 Dialog.addString("Channel A", "LAT", 20);
31 Dialog.addString("Channel B", "CTR433", 20);
32 Dialog.show();
33 ChannelAname = Dialog.getString();
34 ChannelBname = Dialog.getString();
35
36 Dialog.create("Analysis Parameters..");
37 Dialog.addNumber("Channel for "+ChannelAname, 3, 0, 8, "(channel index)");
38 Dialog.addNumber("Channel for "+ChannelBname, 2, 0, 8, "(channel index)");
39 Dialog.addNumber("Channel for APC", 1, 0, 8, "(channel index)");
40 Dialog.addString("Threshold for APC Mask", "Otsu", 20);
41 Dialog.addNumber("Number of Erode for APC Mask", 2, 0, 8, "(number of times)");
42 Dialog.addNumber("Number of Dilate for APC Mask", 0, 0, 8, "(number of times)");
43 Dialog.addNumber("Minimal size for T cell", 40, 0, 8, "(pixels)");
44 Dialog.addString("Threshold for TcellMask", "Default", 20);
45 Dialog.addString("Threshold for ChannelA", "Default", 20);
46 Dialog.addString("Threshold for ChannelB", "Shanbhag", 20);
47 Dialog.addNumber("Number of Dilate and Erode for Tcell Mask", 7, 0, 8, "(number of times)");
48 Dialog.show();
49 ChannelA = Dialog.getNumber();
50 ChannelB = Dialog.getNumber();
51 ChannelAPC = Dialog.getNumber();
52 ThresholdAPCMask = Dialog.getString();
53 nbErodeAPCMask = Dialog.getNumber();
54 nbDilateAPCMask = Dialog.getNumber();
55 MinimumSizeTcell = Dialog.getNumber();
56 ThresholdTcellMask = Dialog.getString();
57 ThresholdChannelA = Dialog.getString();
58 ThresholdChannelB = Dialog.getString();
59 nbDilateTcellMask=Dialog.getNumber();
60
61
62
63 setBatchMode(true);
64
65 /// Variables
66 imagenames=getFileList(dirdata); /// tableau contenant le nom des fichier contenus dans le dossier dirdata
67 nbimages=lengthOf(imagenames); /// longueur du tableau == nombre de fichier dans le dossier
68 nbErodeTcellMask=nbDilateTcellMask;
69 ChannelLAarea=newArray(nbimages);
70 ChannelLBarea=newArray(nbimages);
71 OverlappingArea=newArray(nbimages);
72 RatioOverlapChannelA=newArray(nbimages);
73 RatioOverlapChannelB=newArray(nbimages);
74
75 //Result table settings
76 setResult("Cell index",0,"Cell Index");
77 setResult(ChannelAname+" area",0,ChannelAname);
78 setResult(ChannelBname+" area",0,ChannelBname);
79 setResult("Overlapping area",0,"Overlapping area");
80 setResult("Ratio Overlapping area/"+ChannelAname,0,"Ratio Overlapping area/"+ChannelAname);
81 setResult("Ratio Overlapping area/"+ChannelBname,0,"Ratio Overlapping area/"+ChannelBname);
82 updateResults();
83 IJ.renameResults("Results","My Results");
84
85 number=0;
86
87 //Loop for the images in "dirdata"
88 for(image=0; image<nbimages; image++) {

```



```

89 name=imagenames [image];
90 totname length=lengthOf(name);
91 name length=totname length-4;
92 name1=substring(name, 0, name length);
93
94 number=number+1;
95
96 roiManager("reset");
97
98 open(dirdata+name);
99 selectWindow(name);
100 run("8-bit");
101 rename("temp");
102 selectWindow("temp");
103 run("Split Channels");
104
105 //B cell mask - thresholding
106 selectWindow("C"+ChannelAPC+"-temp");
107 run("Duplicate...", "title=APCMask");
108 setAutoThreshold(ThresholdAPCMask+" dark");
109 //run("Threshold...");
110 run("Convert to Mask");
111 run("Fill Holes");
112 for(j=0; j<nbErodeAPCMask; j++) {
113 selectWindow("APCMask");
114 run("Erode");
115 }
116 for(j=0; j<nbDilateAPCMask; j++) {
117 selectWindow("APCMask");
118 run("Dilate");
119 }
120 rename("APCMask");
121
122 //Channel A thresholding
123 selectWindow("C"+ChannelA+"-temp");
124 setAutoThreshold(ThresholdChannelA+" dark");
125 //run("Threshold...");
126 run("Convert to Mask");
127 run("Duplicate...", "title=tempChannelA");
128 //saveAs("Tiff",dir+ name1+"_LATMask");
129 //rename("C"+ChannelA+"-temp");
130
131 //Channel B thresholding
132 selectWindow("C"+ChannelB+"-temp");
133 setAutoThreshold(ThresholdChannelB+" dark");
134 //run("Threshold...");
135 run("Convert to Mask");
136 run("Duplicate...", "title=tempChannelB");
137 //saveAs("Tiff",dir+ name1+"_Rab6Mask");
138 //rename("C"+ChannelB+"-temp");
139 imageCalculator("Subtract create", "C"+ChannelB+"-temp", "APCMask");
140 selectWindow("C"+ChannelB+"-temp");
141 run("Close");
142 selectWindow("Result of C"+ChannelB+"-temp");
143 rename("C"+ChannelB+"-temp");
144
145 run("Merge Channels...", "c1=tempChannelA c2=tempChannelB create");
146 run("RGB Color");
147 saveAs("Tiff",dir+ name1+"_Masks_Composite");
148
149 //Creation of Overlapping mask
150 imageCalculator("AND create", "C"+ChannelB+"-temp", "C"+ChannelA+"-temp");
151 selectWindow("Result of C"+ChannelB+"-temp");
152 rename("OverlapMask");
153
154
155 //Calculation for LAT area calculation in T cell Mask
156 selectWindow("C"+ChannelA+"-temp");
157 run("Measure");
158 ChannelAArea [image]=getResult("RawIntDen",0)/255;
159 run("Clear Results");
160
161 //Calculation for Rab6 area in T cell Mask
162 selectWindow("C"+ChannelB+"-temp");
163 run("Measure");
164 ChannelBArea [image]=getResult("RawIntDen",0)/255;
165 run("Clear Results");
166
167 //Calculation for Overlapping area in T cell Mask
168 selectWindow("OverlapMask");
169 run("Measure");
170 OverlappingArea [image]=getResult("RawIntDen",0)/255;
171 run("Clear Results");
172
173 // Calculations of Ratios
174 RatioOverlapChannelA [image]=OverlappingArea [image]/ChannelAArea [image];
175 RatioOverlapChannelB [image]=OverlappingArea [image]/ChannelBArea [image];
176
177 //Saving the masks
178 /*selectWindow("C"+ChannelA+"-temp");
179 resetMinAndMax();
180 run("Red");
181 rename(ChannelA);
182 selectWindow("C"+ChannelB+"-temp");
183 resetMinAndMax();

```

```

184 run("Green");
185 rename(ChannelB);
186 selectWindow("APCMask");
187 resetMinAndMax();
188 run("Blue");
189 run("Merge Channels...", "c1="+ChannelA+" c2="+ChannelB+" c3=APCMask create");
190 selectWindow("Composite");
191 saveAs("Tiff",dir+ name1+"_composite");
192 selectWindow("TcellMask");
193 resetMinAndMax();
194 saveAs("Tiff",dir+ name1+"_TcellMask");
195 */
196 run("Close All");
197
198 //Adding Results in the table
199 selectWindow("Results");
200 run("Close");
201
202 IJ.renameResults("My Results", "Results");
203 setResult("Cell index", number, ""+name1); //setResults("Column", row, value)
204 setResult(ChannelAname+" area", number, ChannelAArea[image]);
205 setResult(ChannelBname+" area", number, ChannelBArea[image]);
206 setResult("Overlapping area", number, OverlappingArea[image]);
207 setResult("Ratio Overlapping area/"+ChannelAname, number, RatioOverlapChannelA[image]);
208 setResult("Ratio Overlapping area/"+ChannelBname, number, RatioOverlapChannelB[image]);
209 updateResults();
210
211 IJ.renameResults("Results", "My Results");
212 selectWindow("My Results");
213 saveAs("Results", dir+"My Results.xls");
214 IJ.renameResults("My Results.xls", "My Results");
215 }
216
217 setBatchMode(false);
218 waitForUser("Done! XD");
219 roiManager("reset");
220 //run("Close");

```


Analyse du « clustering » du marquage LAMP1 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse

```

1 // Setup of Fiji parameters
2 run("Set Measurements...", "area mean standard min centroid center integrated display redirect=None decimal=3");
3 run("Options...", "iterations=1 count=1 black edm=Overwrite");
4 run("Colors...", "foreground=white background=black selection=yellow");
5
6 // Directories
7
8 dirdata = getDirectory("Choose the folder containing the data to analyse...");
9 dir = getDirectory("Choose the folder where results will be saved...");
10
11 /// Dialog Box
12
13 Dialog.create("Analysis Parameters");
14 Dialog.addNumber("Channel for cell area staining", 2, 0, 8, "index du canal");
15 Dialog.addNumber("Channel for Lamp1 staining", 1, 0, 8, "index du canal");
16 Dialog.addString("Threshold for Lysosomes", "Li", 20);
17 Dialog.show();
18 channelCellArea = Dialog.getNumber();
19 channelLamp1 = Dialog.getNumber();
20 ThresholdLamp1 = Dialog.getString();
21
22
23 /// Variables
24 imagenames=getFileList(dirdata); /// table containing file names in dirdata
25 nbimages=lengthOf(imagenames); /// table length
26
27
28 setResult("Cell index",0,0);
29 setResult("Cell area",0,0);
30 setResult("Lamp1 area",0,0);
31 updateResults();
32
33 IJ.renameResults("Results", "My Results");
34
35 number=0;
36
37 //Loop for the images in "dirdata"
38 for(image=0; image<nbimages; image++) {
39     name=imagenames[image];
40     totnamelength=lengthOf(name);
41     namelength=totnamelength-4;
42     name1=substring(name, 0, namelength);
43
44     //Loop for the images in "dirdata" and selection of the cells and save Cell ROI
45     open(dirdata+name);
46     selectWindow(name);
47     roiManager("reset");
48     run("Clear Results");
49     run("Split Channels");
50
51     run("ROI Manager...");
52     roiManager("Show All");
53     selectWindow("C"+channelCellArea+"-"+name);
54     setTool("freehand");
55     run("Green");
56     waitForUser("Add cells to ROI Manager");
57
58     roinumber=roiManager("Count");
59     roiManager("Save", dir + name1+"_ROI.zip");
60
61     ///LAMP1 mask
62     selectWindow("C"+channelLamp1+"-"+name);
63     run("Auto Threshold", "method=Li white");
64
65     ///For each selected cell, calculation of Cell area and LAMP1 area calculation
66     CellArea=newArray(roinumber);
67     LampArea=newArray(roinumber);
68
69     for (indexroi=0; indexroi<roinumber; indexroi++){
70         roiManager("open", dir + name1+"_ROI.zip");
71         selectWindow("C"+channelLamp1+"-"+name);
72         roiManager("Select", indexroi);
73         run("Measure");
74         CellArea[indexroi]=getResult("Area", 0);
75         run("Clear Results");
76         run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity pixel display clear add");
77
78         LampArea[indexroi]=0;
79         for (i=0; i<nResults; i++){
80             LampArea[indexroi]=LampArea[indexroi]+getResult("Area", i); //Calculation of LAMP1 total area by summing the multiple LAMP1 ROI
81         }
82
83         run("Clear Results");
84         selectWindow("ROI Manager");
85         run("Close");
86     }

```

```
87
88 selectWindow("Results");
89 run("Close");
90 IJ.renameResults("My Results", "Results");
91
92 ///Filling of Results table
93 for (indexroi=0; indexroi<roiNumber; indexroi++){
94     setResult("Cell index", indexroi+number, name1+"_cell"+indexroi);
95     setResult("Cell area", indexroi+number, CellArea[indexroi]);
96     setResult("Lamp1 area", indexroi+number, LampArea[indexroi]);
97     updateResults();
98 }
99 IJ.renameResults("Results", "My Results");
100 for (indexroi=0; indexroi<roiNumber; indexroi++){
101     number=number+1;
102 }
103
104 ///Saving of the results
105 selectWindow("My Results");
106 saveAs("Results", dir+"My Results.xls");
107 IJ.renameResults("My Results.xls", "My Results");
108
109 selectWindow("C"+channelLamp1+"-"+name);
110 saveAs("Tiff", dir+name1+"_maskLysos.tif");
111 run("Close");
```